

SÉRIE A. — N° 868
N° D'ORDRE : 1.670

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

CLAUDE-MARIE-JEAN VERNE

Docteur en médecine

Préparateur-Chef de laboratoire de recherches d'Histologie à la Faculté de médecine de Paris

1^{re} THÈSE. — Les pigments tégumentaires des Crustacés décapodes. —
Introduction à l'Étude histochimique des pigments ani-
maux.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le ~~24~~ Mars 1921 devant la Commission d'examen

MM. LAPICQUE, *Président.*

DEREIMS

COMBES

PRENANT

} *Examineurs.*

PARIS
ÉDITIONS MÉDICALES
7, RUE DE VALOIS, 7

—
1921

LES PIGMENTS TÉGUMENTAIRES

DES

CRUSTACÉS DÉCAPODES

SÉRIE A. — N° 868
N° D'ORDRE : 1.670

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

CLAUDE-MARIE-JEAN VERNE

Docteur en médecine

Préparateur-Chef de laboratoire de recherches d'Histologie à la Faculté de médecine de Paris

1^{re} THÈSE. — Les pigments tégumentaires des Crustacés décapodes. —
Introduction à l'Étude histochimique des pigments animaux.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Mars 1921 devant la Commission d'examen



MM. LAPICQUE, *Président.*

DEREIMS

COMBES

PRENANT

} *Examineurs.*

PARIS
ÉDITIONS MÉDICALES
7, RUE DE VALOIS, 7

—
1921

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.
Doyen.....	MOLLIARD, <i>Professeur</i> , Physiologie végétale.
Doyen honoraire.....	P. APPELL.
	P. PUISEUX.
	VÉLAIN.
Professeurs honoraires..	BOUSSINESQ.
	BOUTY.
	LIPPMANN..... Physique.
	E. PICARD..... Analyse supérieure et algèbre supérieure.
	Gaston BONNIER.. Botanique.
	KÉNIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
	GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
	HALLER..... Chimie organique.
	JOANNIS..... Chimie (Enseignement P. C. N.).
	JANET..... Electrotechnique générale.
	WALLERANT..... Minéralogie.
	ANDOYER..... Astronomie.
	PAINLEVÉ..... Mécanique analytique et mécanique céleste.
	HAUG..... Géologie.
	H. LE CHATELIER.. Chimie générale.
	Gabriel BERTRAND. Chimie biologique.
	M ^{me} P. CURIE..... Physique générale.
	CAULLERY..... Zoologie (Evolution des êtres organisés)
	C. CHABRIÉ..... Chimie appliquée.
	G. URBAIN..... Chimie minérale.
Professeurs.....	Emile BOREL..... Calcul des probabilités et Physique mathématique,
	MARCHIS..... Aviation.
	Jean PERRIN..... Chimie physique.
	G. PRUVOT..... Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
	MATRUCHOT..... Botanique.
	ABRAHAM..... Physique.
	CARTAN..... Mécanique rationnelle.
	Cl. GUICHARD..... Géométrie supérieure.
	LEBESQUE..... Application de l'analyse à la Géométrie.
	LAPICQUE..... Physiologie.
	GENTIL..... Géographie physique.
	VESSIOT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
	COTTON..... Physique théorique et Physique céleste.
	DRACH..... Mathématiques générales.
	C. FABRY..... Physique.
	N..... Histologie.
	N..... Zoologie, anatomie, physiologie comparées.
	LEDUC..... Physique.
	HÉROUARD..... Zoologie.
	LÉON BERTRAND.. Géologie.
	Rémy PERRIER... Zoologie (Enseignement P. C. N.).
	LESPICAU..... Chimie.
Professeurs adjoints....	SAGNAC..... Physique théorique et physique céleste.
	PEREZ..... Zoologie (Evolution des êtres organisés)
	RABAUD..... Biologie générale.
	PORTIER..... Physiologie.
	BLAISE..... Chimie organique.
	PÉCHARD..... Chimie (Enseignement P. C. N.).
Secrétaire.....	Daniel TOMBECK.

SECONDE THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTE

Géologie :

Les Crustacés fossiles

Botanique :

Les pigments chlorophylliens

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 29 janvier 1921

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. APPELL.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552825_0037

A MON MAITRE

M. LE PROFESSEUR PRENANT

Les Pigments Tégumentaires des Crustacés Décapodes

Introduction à l'Étude Histochimique des Pigments animaux

AVANT-PROPOS

L'esprit dans lequel est conçue cette étude surprendra peut-être, puisqu'il en existe encore, les histologistes pour qui la morphologie constitue tout l'horizon de la science. Ils n'admettront guère que l'on puisse, dans un but de recherche histologique, s'aventurer dans le domaine de la chimie. Aussi, je crois utile de faire ici une profession de foi, d'exposer les idées qui m'ont poussé à traiter ce travail suivant une telle conception.

Si l'on veut bien considérer l'état actuel de la science histologique, on peut dire qu'au point de vue purement descriptif, au point de vue morphologique, elle a atteint ou à peu près la perfection. La plupart des problèmes qui restent non résolus reposant sur des questions de mots, sont actuellement engagés dans des impasses. Est-ce à croire que l'histologie ait dit son dernier mot et qu'il faille la considérer dès maintenant comme une science ayant fini d'évoluer, comme une science morte ? Il n'y a là qu'une apparence due à une méprise sur le vrai but de l'histologie, qu'un trop grand nombre de chercheurs,

trompés par des méthodes qui attiraient uniquement l'attention sur la forme, ont cru être la Morphologie. J'estime tout au contraire que l'histologie est dans sa période de formation et que c'est d'elle qu'il faut attendre la solution de bien des problèmes biologiques qui — c'est devenu un lieu commun de le répéter aujourd'hui — sont en dernière analyse des problèmes cellulaires. Et des progrès de l'histologie dépendent les progrès de toutes les sciences qui se rattachent à la vie. Dès 1898, avec une admirable clairvoyance, le Professeur PRENANT montrait que la « connaissance de la forme n'est qu'une phase préliminaire nécessaire » dans la recherche de l'explication du fonctionnement, véritable but de l'histologie.

C'est qu'en effet l'histologie doit être dans toute son acception ce que dit son nom la science des tissus comme un de ses principaux chapitres la cytologie doit être la science de la cellule, se préoccupant de la vie du tissu et de la cellule sous tous leurs aspects. Elle doit être en un mot la biologie cellulaire. La morphologie ne peut plus être qu'un de ses instruments de travail et si les méthodes morphologiques sont susceptibles de rendre encore des services, c'est à la condition de ne plus servir à étudier la forme en soi.

L'histoire de l'histologie, à ce point de vue, peut se partager en trois périodes. BICHAT, qui est à juste titre considéré comme le fondateur de la science des tissus, se souciait si peu de la forme de leurs éléments qu'il ne se servait pas de microscope en qui il n'avait pas confiance. Lorsqu'on fut revenu du discrédit où était tombé ce précieux instrument, les histologistes l'utilisèrent, mais les RANVIER, les POUCHET, les ROUGET, les ROBIN,

pour ne citer que quelques Français, faisaient appel à la physiologie ou à la chimie pour compléter les résultats de leurs recherches. Cependant, les méthodes destinées à obtenir des coupes fines faisaient des progrès, et l'on crut être arrivé à la perfection avec les techniques d'inclusion et de coloration classiques qui furent systématiquement employées pour l'étude de tous les tissus et de tous les organes dont elles permirent de décrire les plus petits détails de structure. Mais on ne voyait pas qu'en se soumettant uniquement à ces techniques, on perdait de vue le vrai but de l'histologie. Nous entrons actuellement dans une troisième phase. On se rend compte qu'une science purement morphologique a fini son temps. A l'instigation d'esprits remarquables, un mouvement se dessine vers une autre conception. PRENANT a consacré un cours de son enseignement spécial à cette manière de voir et ne se lasse pas d'en être l'apôtre. POLICARD, en prenant possession de la chaire d'histologie de Lyon, a exposé de semblables idées. Bien d'autres savants, par leurs travaux ou par leur enseignement, les ont déjà mises en pratique.

Ces idées comportent un changement radical dans la mise en œuvre des méthodes de l'histologie. En perfectionnant les techniques proprement morphologiques, en élargissant les méthodes, en utilisant de nouveaux colorants, on peut obtenir des préparations plus complètes, plus brillantes, plus faciles à lire, mais rien de plus. Employées comme elles le sont ordinairement, ces méthodes ne nous diront pas la nature ou l'origine de ce que nous avons sous les yeux, ce qui est pourtant le but de toute recherche scientifique.

L'histologie, pour être comme je l'ai définie, la bio-

logie cellulaire, doit faire appel au concours d'autres sciences et combiner leurs méthodes avec les siennes. Cette collaboration peut se faire efficacement de deux façons.

Tout d'abord, elle peut consister en l'emploi de méthodes parallèles, se contrôlant et se complétant réciproquement, destinées à montrer l'évolution d'un phénomène sous différents aspects dont l'observation histologique permettra de saisir les phases figurées, non point en abstraction, comme le ferait un morphologiste pur, mais en rapport avec les propriétés physiques et chimiques et les fonctions de la matière vivante.

A un deuxième point de vue, la collaboration sera plus étroite encore. Le phénomène ne sera plus dissocié. L'expérimentation aura lieu sous le microscope même. Ce sera la reproduction sur l'unité du tissu ou de l'organe des résultats obtenus par les méthodes macroscopiques. Les recherches histologiques et physiologiques menées ainsi de pair ouvrent aux chercheurs un champ inépuisable.

Parmi les sciences dont SPENCER et COMTE avaient fait les fondements des sciences d'observation, la chimie occupe une place prépondérante, et je crois qu'il y a lieu d'espérer aussi des résultats féconds de la collaboration étroite de cette science et de l'histologie. C'est dans cet esprit que j'ai entrepris ce travail. J'ai réalisé la collaboration des deux sciences selon les modes que je viens d'indiquer et sur lesquels j'aurai à revenir longuement. Mes recherches sont la réalisation de cette manière de voir et leurs conclusions démontreront, je l'espère, son utilité.

L'objet auquel je consacre ce mémoire, est l'étude des

pigments tégumentaires. Dans aucune question, peut-être, il n'est davantage flagrant à quels résultats limités ont abouti les méthodes de pure morphologie sans aucune préoccupation biologique. Les travaux de BALLOWITZ sur les chromatophores des poissons constituent un spécimen de ce genre. La plupart des travaux que j'aurai à rappeler au cours de ce travail sont inspirés de la même idée : accumuler des détails descriptifs sans chercher à en comprendre la signification. Leur exposé montrera, du reste, combien stérile est un pareil esprit. Il résulte de là que la plus grande confusion continue à régner dans la connaissance de ces pigments (1), leur étude ne pouvant avoir quelque intérêt que si, ne se tenant pas à une sèche description morphologique, elle envisage leur nature, leur formation, leur évolution, en un mot tout leur métabolisme. Aussi j'ai pensé qu'aucun sujet n'était plus favorable à l'application des idées que je viens d'exposer. Je me suis rendu compte que c'est seulement en menant parallèlement l'investigation histologique et l'investigation chimique que l'on en pourrait résoudre les problèmes. Mes goûts et mes études antérieures m'orientaient dans cette voie ; aussi est-ce avec enthousiasme que je m'y suis engagé. C'est dans une classe d'Invertébrés, chez les Crustacés, que j'ai poursuivi ces recherches. Ce choix, que je dois à mon maître, M. le professeur PRENANT, en plus de l'intérêt qu'il peut y avoir au point de vue zoologique à mieux connaître l'histologie et la physiologie de cette vaste classe, est très heureux à un point de vue théorique. Les recherches pratiquées chez les Invertébrés ont, sur la

(1) Se reporter au travail d'ensemble de Mandoul (1903).

biologie générale, une influence favorable par le fait qu'elles tendent à détrôner l'anthropomorphisme dont les effets néfastes se font encore si vivement sentir dans les sciences de la vie.

Telles sont les justifications de l'objet et de la conception de mon travail. Puissent les résultats que j'ai obtenus ne pas être indignes du maître qui, non seulement en a été l'instigateur et l'a soutenu par la fécondité des idées qui rayonnent de son enseignement, mais à qui je dois encore, matériellement et intellectuellement, tout ce que j'ai pu réaliser jusqu'à ce jour dans le domaine biologique qui m'est si cher.

Ce n'est qu'une bien faible partie de ma reconnaissance que j'exprime en priant M. le professeur PRENANT d'agréer, avec la dédicace de cette œuvre inspirée par sa pensée, l'hommage de mon admiration et de mon attachement.

M. le professeur LAPICQUE m'a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de ma thèse. Je lui en témoigne ma respectueuse et profonde gratitude. Le fait qu'un illustre physiologiste accueille l'œuvre d'un histologiste a pour moi une signification particulière. J'y vois le couronnement le plus heureux des idées que j'ai exposées dans cet avant-propos.

Parmi les maîtres qui ont contribué à ma formation biologique, il en est d'autres que je n'aurai garde d'oublier et je suis heureux de l'occasion qui s'offre à moi de le dire publiquement. M. le professeur MULLER, d'Alger, m'a initié à la chimie. M. le professeur WEBER m'a dévoilé l'histologie; il sait quelle reconnaissance je lui en garde. MM. les professeurs BATAILLON et TOPSENT ont complété mon éducation biologique. C'est une fierté

pour moi d'avoir été leur élève et je leur dis à tous merci.

Dans l'exécution même de ce travail, j'ai rencontré auprès de M. le professeur MERCIER un accueil et une obligeance qui m'ont touché. C'est grâce à mes séjours au laboratoire maritime de Luc-sur-Mer, qu'il a su réorganiser si excellemment, que j'ai pu réaliser en grande partie mes recherches. Je le prie d'agréer mes respectueux remerciements.

J'adresse un amical souvenir à mes camarades de laboratoire, tout spécialement à mon collègue et ami TURCHINI.

PLAN DU TRAVAIL

La partie principale et entièrement originale de mon travail est constituée par mes recherches histo-chimiques sur les pigments tégumentaires des crustacés décapodes et leur métabolisme.

Avant d'aborder cette partie essentielle il me sera nécessaire :

1° De faire connaître la répartition des pigments que je vais étudier et, après avoir décrit leur situation, de préciser l'origine et l'évolution des chromatophores. Les données recueillies dans différents travaux seront complétées par un certain nombre d'observations personnelles ;

2° De présenter les résultats qui ont été acquis par des méthodes de pure morphologie dans la question qui fait l'objet de ce travail. Mes recherches, s'orientant dans un sens tout différent, il serait difficile, au cours de leur exposé, de rappeler ces travaux que je ne puis passer sous silence. J'en ferai une rapide revue qui aura trait, dans un premier chapitre, à la description du chromatophore lui-même et, dans un autre chapitre, aux classifications morphologiques des substances pigmentaires.

CHAPITRE PREMIER

La répartition des pigments tégumentaires

Sommaire. — Répartition des pigments. Leur localisation dans l'hypoderme et la carapace par l'étude histologique de ces formations. Développement des chromatophores et des systèmes pigmentaires.

Les pigments tégumentaires des Crustacés décapodes ne sont pas seulement contenus dans des chromatophores (1). A vrai dire, ce seraient ceux-là qui intéresseraient seuls l'histologie telle qu'elle est généralement conçue, mais dans une étude qui ne veut pas s'en tenir au cadre étroit de la morphologie, il serait inadmissible de ne pas envisager les substances colorées qui, se répandant dans les tissus, proviennent en dernière analyse des pigments des chromatophores et permettent d'en éclairer l'histo-physiologie.

Ainsi comprises les substances pigmentaires peuvent se trouver :

1° Dans l'hypoderme proprement dit ;

2° Dans la carapace chitino-calcaire.

Le principal pigment qui colore le tégument, celui à qui les Décapodes doivent leur teinte générale, à une répartition

(1) J'emploierai indifféremment au cours de ce travail les noms de chromatophore et de cellule pigmentaire. Certains auteurs réservent le nom de chromatophore pour des éléments formés de l'association de cellules pigmentaires, véritables organes pigmentaires, comme il en existerait chez les Céphalopodes (POUCHET).

beaucoup plus large chez ces Crustacés. Pour comprendre son métabolisme, il faut l'étudier dans ses différentes localisations qui sont les cellules ovulaires, les œufs et le plasma sanguin.

Je reviendrai longuement sur les différents aspects histologiques et chimiques présentés par les pigments suivant les régions où on les rencontre. Pour faciliter la compréhension de ce qui va suivre, je rechercherai la localisation des pigments dans l'hypoderme et dans la carapace en retraçant la structure histologique de ces formations tégumentaires.

Les conditions bio-chimiques de l'apparition des pigments dans des chromatophores ne se trouvent généralement réunies que dans l'hypoderme. Cependant il faut noter que les chromatophores dérivant du mésenchyme, comme je le vais montrer, se rencontrent à l'état adulte côte à côte avec les autres éléments provenant de ce tissu. On peut voir des cellules pigmentaires dans le tissu conjonctif entourant les organes. On en observe aussi — et le fait est signalé par KEEBLE ET GAMBLE (1904) — chez *Hippolyte* autour de l'hépatopancréas, de l'intestin et des muscles. L'estomac de *Nephrops norvegicus* est enveloppé d'une gaine conjonctive qui contient des chromatophores. Leur description est dans ces cas toute semblable.

Histologie de l'hypoderme et de la carapace

On donne chez les Invertébrés et chez les Crustacés en particulier le nom d'hypoderme à la membrane tégumentaire qui tapisse la face interne de la carapace chitineuse plus ou moins imprégnée de calcaire, et qu'il est aisé de délaminer en soulevant cette carapace. L'hypoderme comprend une formation épithéliale: un épiderme et sous cet épiderme un véritable derme.

Les cellules épidermiques sont cylindriques. Distalement elles s'attachent à la carapace. Basalement elles se perdent

dans le tissu conjonctif. Le noyau est central. Entre les cellules se rencontrent du tissu conjonctif et d'étroites lacunes sanguines, c'est-à-dire que au moins dans leur partie moyenne les cellules épidermiques ne sont pas contigues et fréquemment les chromatophores viennent s'insinuer jusqu'à la surface. SCHNEIDER (1902) décrit dans les cellules épidermiques des fibrilles courant parallèlement à leur grand axe. Il s'agit là de tonofibrilles, analogues à celles que DEL RIO HORTEGA (1917) a décrites dans les cellules épithéliales chez les Annélides, les Mollusques et les Vertébrés. Dans les régions où l'hypoderme se réfléchit sur lui-même comme dans la portion des téguments qui recouvrent les chambres branchiales, les cellules épidermiques sont extraordinairement longues et il existe de véritables ponts de fibrilles qui unissent les deux épidermes, externe et interne.

La partie profonde de l'hypoderme ou derme est essentiellement constituée par du tissu conjonctif, des vaisseaux et lacunes sanguines et quelques glandes du type muqueux.

J'insisterai un peu sur la description du tissu conjonctif qui me sera utile. D'après les traités classiques, comme ceux de SCHNEIDER, ce tissu se ramène aux cellules de LEYDIG de premier ordre, de deuxième et de troisième ordre, ainsi désignées suivant leur degré de différenciation. Les premières sont généralement arrondies ou étoilées, se déformant par pression réciproque. Les deuxièmes se montrent très différenciées avec des termes de passage; elles sont allongées et leurs prolongements forment des fibres pouvant se condenser aussi sous forme de lamelles. Quand le développement des fibres est très riche et qu'il ne reste du cytoplasma que des traces, le tissu ressemble au tissu conjonctif véritable et en tient la place. Il y a cependant toujours la différence fondamentale que dans le tissu cellulaire la fibrillation dérive d'un véritable échafaudage cellulaire, tandis que, dans le tissu conjonctif vrai elle résulte de la différenciation fibrillaire d'une substance fondamentale séparée de la cellule. Les cellules de LEYDIG de troisième ordre se rencontrent autour des vaisseaux. Leurs prolongements en se condensant forment une lamelle limitante, véritable intima, et une adventice située

extérieurement. L'opinion classique exposée par SCHNEIDER (1902) était que les vaisseaux chez les Anthropodes sont dépourvus d'endothélium. BERGH (1902) a montré que, en particulier chez les Crustacés, les petits et les moyens vaisseaux possédaient une paroi endothéliale. Dans les lacunes sanguines, les cellules de la paroi ont plus généralement le caractère des cellules de LEYDIG de premier ordre. Ces dernières étant les moins différenciées dans le sens d'éléments de soutien, présentent fréquemment un protoplasma riche en grains et peuvent emmagasiner du glycogène.

Tous ces éléments forment l'échafaudage qui soutient l'hypoderme. C'est dans ses mailles que l'on rencontre les cellules pigmentaires. Par leurs caractères généraux elles se rapprochent des cellules de LEYDIG de premier ordre et nous verrons qu'il faut leur reconnaître une commune origine mésenchymateuse. On rencontre des cellules pigmentaires dans toute l'épaisseur de l'hypoderme. Celles qui sont situées profondément ont une disposition remarquable autour des lacunes et des vaisseaux sanguins auxquels elles forment un périthélium. Ces cellules se montrent du reste capables d'émigrer vers la surface. Je montrerai en étudiant la formation de la mélanine l'importance de ces faits. Les chromatophores superficiels poussent des prolongements entre les cellules épidermiques et paraissent ainsi sur le même niveau que ces dernières. Leur densité est très uniforme dans les différentes régions de l'hypoderme, mais leur métabolisme varie, c'est-à-dire que leurs enclaves pigmentaires sont différentes suivant que l'on considère les téguments recevant la lumière solaire directement et ceux qui ne la reçoivent pas directement. Suivant les espèces animales la densité des chromatophores est également assez variable. Toutes ces questions seront scrupuleusement étudiées en leur place. Je rappellerai ici la loi de HEUSINGER, sur laquelle insiste POUCHET (1876) et suivant laquelle il y a antagonisme entre les cellules graisseuses et les pigmentaires dans une région donnée, comme si lorsque la différenciation s'est faite au point de vue pigmentaire il n'y avait plus de cellules capables d'élaborer de graisse. En d'autres termes, suivant les

conditions du milieu, les mêmes éléments élaboreraient de la graisse ou du pigment.

Dans l'hypoderme, les pigments peuvent avoir d'autres localisations que les chromatophores. Ces éléments jouent un rôle important dans l'histoire des pigments et leur étude est capitale. Mais des dérivés pigmentaires peuvent apparaître dans les cellules ectodermiques, qui sont alors des cellules pigmentées suivant la définition de PRENANT, ou imprégner l'hypoderme d'une manière plus ou moins homogène. Dans ces cas la matière pigmentaire est soit à l'état cristallin, comme chez *Astacus* ou *Galathea*, soit à l'état dissous, comme chez *Palamon* et chez les Crustacés à pigment bleu nocturne.

Carapace

La carapace ne représente pas autre chose que la cuticule énormément développée de l'épiderme externe. Elle est formée de composés organiques, principalement de chitine, et de sels de chaux. Il est facile de constater qu'il existe une stratification parallèle au plan superficiel et qui a des aspects différents suivant la hauteur. La description de BÜTSCHLI (1899) est généralement adoptée. Il distingue :

1° Une couche externe de 7 μ environ qui paraît homogène et se colore intensément;

2° Une couche pigmentée très large, nettement stratifiée mais plus dense extérieurement qu'intérieurement. C'est cette couche qui donne sa couleur à la carapace;

3° Au dessous est la couche principale, la plus puissante, stratifiée inversement à la précédente. Au niveau de l'épiderme la stratification cesse d'être reconnaissable.

La carapace est traversée dans toute son épaisseur par des fibres cuticulaires qui sont les prolongements directs des fibrilles des cellules épidermiques (TULLBERG, d'après SCHNEIDER). J'ai moi-même observé, sur des coupes pratiquées lors du renouvellement de la carapace après la mue, que ces fibrilles reposent chacune sur un corpuscule basal, ce qui rapproche les cellules en question des adamantoblastes et fournit un

exemple de plus des modalités des formations ciliées. Entre ces fibrilles se trouve une substance cimentante homogène, présentant une stratification différente suivant les régions. Enfin on a signalé des canalicules étroits parcourant la carapace et très visibles sur les coupes tangentielles et transversales. Ils traversent toutes les couches de la carapace mais ne débouchent pas au dehors. Pour SCHNEIDER, ils représentent le chemin de substances fluides, si bien que malgré sa charge calcaire la carapace n'est pas une formation morte.

Au point de vue spécial qui m'occupe, le pigment ne se trouve que dans la couche dite pour cette raison couche pigmentée. Quand il s'agit de pigment bleu ou rouge (dérivé de la zooérythrine) il imprègne sous forme de fines taches ou de piqueté le substratum, s'y trouvant, comme je le montrerai en étudiant la chimie de ces pigments, à l'état de combinaison protéique. Quand il s'agit de pigment noir, et le cas est fréquent chez les crustacés porteurs de mélanine, il apparaît sous forme de grains fins, inclus dans le substratum de la région toute externe de la couche pigmentaire. La couche dite principale n'est jamais colorée, et, vue par sa face interne, apparaît d'un blanc éclatant. On peut se demander comment les pigments se trouvent ainsi inclus dans la couche externe de la carapace, alors que la couche interne, qui est en contact avec l'hypoderme contenant les cellules pigmentaires, ne présente pas trace de pigments.

Les canalicules auxquels SCHNEIDER attribue un rôle dans la circulation des liquides dans la carapace sont-ils en jeu ? Je ne le crois pas. La carapace se pigmente, à mon avis, à l'époque de sa formation. Cette formation commence, bien avant la chute de l'ancienne carapace à la mue, par l'édification d'un *Substratum* qui paraît être, d'après mes observations, le résultat de deux processus : l'un de transformation, l'autre de néoformation. Celui de transformation intéresse la couche superficielle de l'hypoderme sous-jacent, c'est-à-dire le sommet des cellules épidermiques. On comprend que les éléments qui, situés au même niveau que ces cellules, les séparent pour s'insinuer

jusqu'à la surface, comme le font les prolongements des chromatophores, puissent se trouver inclus dans le substratum résultant de ce processus, s'il s'agit de mélanine, ou entrer en combinaison chimique avec un protéique de ce substratum, s'il s'agit de zooérythrine. Cette transformation se fait par poussées successives et donne la couche dite pigmentée. Quand, à la suite de ce processus, la partie superficielle se montre comme décapitée, apparaît le processus de néoformation dans lequel les cellules épidermiques interviennent par une véritable activité sécrétrice en déposant à la face inférieure des couches précédentes une série de strates. Ces strates ne comprendront pas de pigment, seront incolores et d'une composition chimique sans doute différente.

Tous ces processus paraissent guidés par les fibrilles issues des cellules épidermiques. Après la chute de la vieille carapace, la substance fondamentale de la nouvelle est entièrement constituée et, bien que molle, possède ses couleurs définitives. Son durcissement s'opère alors. Il serait intéressant de rechercher, par un procédé histo-chimique, si les sels calcaires dont la précipitation amènent le durcissement apparaissent seulement à ce moment ou préexistent à l'état soluble dans la substance fondamentale.

On peut rapprocher les processus que je viens de décrire de ceux de la formation de l'ivoire. Il y a analogie entre les fibrilles des cellules épidermiques et les fibres de Tomes des odontoblastes. Le cas de la carapace des Crustacés paraît concilier les théories ayant cours sur la formation de l'ivoire et de l'émail, puisqu'il y aurait d'abord une véritable substitution, puis une sécrétion due à l'activité des cellules épidermiques.

Origine et développement des Chromatophores

Les chromatophores ayant toujours paru chez les Crustacés d'une importance systématique secondaire, et leur répartition semblant inconstante, il n'y a pas lieu de s'étonner que l'étude de leur développement ait été négligée par les

zoologistes. On rencontre quelques données dans les travaux de POUCHET. Mais il faut arriver à KEEBLE et GAMBLE (1904) pour trouver les premières recherches coordonnées dans ce sens. Encore ont-elles trait bien moins à l'origine des premiers chromatophores qu'à leur évolution au cours du développement des jeunes embryons. D'après POUCHET, il y a déjà chez *Homarus* des chromatophores rouges bien développés quand le vitellus occupe encore la moitié de l'œuf. Ce sont des cellules non granuleuses qui se contractent déjà. Chez *Palinurus*, le pigment rouge apparaît pareillement dans l'œuf. Chez *Crangon*, POUCHET distingue les pigments, au point de vue de leur apparition, en deux catégories : un pigment jaune suivi d'un violet et un pigment rouge plus tardif. Cette observation cadre avec les miennes.

Les données de KEEBLE et GAMBLE, quant à l'origine des cellules pigmentaires, sont assez confuses. Les chromatophores sont d'abord des éléments non ramifiés. Aussitôt que les cellules pigmentaires sont devenues étoilées, le pigment commence à fonctionner. Les auteurs anglais ont observé les premiers stades sur des embryons de *Macromysis flexuosa* de deux millimètres de long encore contenus dans la poche de la mère. Dans un premier mémoire, ils admettent sans discussion que les chromatophores sont des proliférations de l'épiderme qui s'enfoncent dans les tissus.

Ils sont composés de plusieurs cellules entourant un protoplasma sans noyau. Le groupe de cellules se sépare de la surface puis pousse des prolongements qui ne se pigmentent que plus tard. On ne voit d'abord qu'une substance noire opaque en masse ; un pigment jaune réfringent apparaît ensuite, puis un pigment brun. WAGNER (1896) a décrit également des éléments qu'il appelle « *Pigmentdrüsen* » comme provenant de l'épiderme. Cependant KEEBLE et GAMBLE semblent revenir sur leur première opinion, puisque dans un second mémoire (1906) ils décrivent les chromatophores à leur stade jeune comme consistant en cellules conjonctives étoilées. J'ai cherché à mon tour à préciser l'époque de l'apparition des premières cellules pigmentaires et à déterminer aux dépens de quels éléments elles prenaient naissance.

J'ai étudié à cet effet des œufs et des larves de *Crangon vulgaris*, *Pisa tetraodon*, *Pinnotheres pisum*, *Carcinus maenas*. Les œufs étaient examinés à l'état frais par transparence. Pour préciser la situation des chromatophores, des coupes en série étaient pratiquées mais elles ne me permettaient de repérer que les chromatophores de la série que j'étudierai au cours de mon travail sous le nom de série azotée, le contenu des chromatophores rouges ne pouvant être conservé par aucun procédé au cours de l'inclusion. Si donc mes observations, quant à l'époque de l'apparition des premières cellules pigmentaires, s'appliquent à toutes ces cellules, mes conclusions en ce qui concerne leur origine ne peuvent s'appliquer avec certitude qu'aux chromatophores de la série azotée. C'est en se basant sur leur similitude que l'on peut appliquer aux autres une semblable origine.

L'apparition des chromatophores de la série azotée est précoce. On voit du pigment élaboré dans le cytoplasma de l'une des premières cellules mésenchymateuses, c'est-à-dire de l'un des premiers éléments étoilés libres émanant d'un feuillet. Il y a d'abord un chromatophore unique et on peut l'observer bien avant que le corps de l'embryon ait pris forme, postérieurement à la gastrulation et à l'apparition du mésoderme, alors que l'œuf est encore très chargé de vitellus. Ce premier chromatophore contient un pigment jaune, réfringent que je qualifierai par la suite de pigment amino-acide. La mélanine n'apparaît qu'ensuite dans les mêmes éléments et ce sera un argument de plus que j'aurai à invoquer en faveur de l'origine que j'attribue à la mélanine et une preuve que chez les Crustacés ce pigment reconnaît toujours la même origine. L'aspect que l'on rencontre le plus fréquemment est celui d'un chromatophore jaune en train de se transformer en mélanophore. A mesure que le développement va se poursuivre le nombre des chromatophores augmentera, mais ils apparaîtront métamériquement avec une régularité parfaite (pl. II. fig. 9.).

BOLK (1908) a observé chez les Téléostéens la disposition métamérique des chromatophores. Elle est encore plus nette chez les Crustacés, en raison de l'évidence de la segmentation,

et est des plus faciles à contrôler en examinant des larves de Crustacés quelconques. Dans chaque segment une et parfois deux cellules mésenchymateuses se sont différenciées en cellules pigmentaires. Nous trouvons là un exemple de plus de la diversité des sens dans lesquels peuvent évoluer les éléments mésenchymateux. Tandis que les uns se différencient mécaniquement pour former les éléments de soutien, les autres deviennent des élaborateurs de substances variées: graisse, glycogène, pigment et remplissent une fonction chimique. J'ai rappelé plus haut l'antagonisme entre graisse et pigment.

Comment cette répartition si particulière des chromatophores chez l'embryon aboutit-elle à l'abondance et au désordre apparent que l'on observe chez l'adulte ? C'est la question que se sont posée KEEBLE et GAMBLE dans leurs travaux et sur ce point ils sont arrivés à des conclusions nettes et intéressantes. Les auteurs anglais se sont d'abord adressés à un petit ordre voisin des Décapodes, les Schizopodes. Ils ont étudié l'apparition des systèmes pigmentaires d'abord chez les Mysidés (*Macromysis flexuosa*), où la disposition est typique et persiste telle qu'elle est à l'état embryonnaire pendant toute la vie de l'adulte. Les chromatophores apparaissent en trois groupes qui d'après leur situation sont qualifiés de groupe neural, groupe viscéral et groupe caudal. Dans chacun de ces groupes la disposition métamérique est la règle. Dans le groupe neural se développant d'avant en arrière, un chromatophore d'abord, puis une paire sont opposés à chaque ganglion nerveux. Les chromatophores du groupe viscéral sont en rapport, comme leur nom l'indique, avec les organes, savoir: d'avant en arrière l'estomac, le cœur, l'hépatopancréas, les gonades, l'intestin. Enfin le groupe caudal comprend des chromatophores situés dorsalement sur chacun des segments abdominaux et sur le dernier thoracique. A côté de ces groupes principaux se montrent des groupes accessoires, à la base des pédoncules oculaires, sur les antennes, sur les lamelles incubatrices. Cet ensemble dit système primaire reste à l'état à peu près pur chez les

Mysidès, et on le retrouve très semblable chez les larves de Décapodes.

Si l'on étudie une larve de *Crangon* encore contenue dans l'œuf, on voit qu'il existe deux groupes de cellules pigmentaires, un neural et un caudal, se développant comme chez *Mysis*. Mais le nombre des centres neuraux représentés dans le thorax est réduit ici ainsi que dans le stade *Zoë*, en raison de la suppression de la majorité des segments et appendices thoraciques. Les centres accessoires apparaissent. Enfin au stade *Mysis* le groupe neural se complète avec l'apparition des membres thoraciques et il se forme un groupe viscéral. Chez l'adulte ce système primaire persiste, mais il est recouvert et obscurci par un système secondaire de chromatophores qui produisent la coloration de l'animal, le système primaire n'y ayant que peu de part. Le système secondaire se développe partiellement en relation avec le primaire, en partie indépendamment (carapace, côtés de la queue). L'individualité des centres de chromatophores se perd vite et il est impossible à l'état adulte de retrouver l'indication de l'arrangement métamérique primitif des chromatophores en centres isolés. KEEBLE et GAMBLE décrivent avec détails le développement des centres primaire et secondaire chez *Hippolyte Varians*, *Hippolyte Cranchi*, *Palæmon*, chez les Brachyours et chez *Galatæa Squamifera*. Il y a d'un animal à l'autre de petites variations dans l'ordre et la vitesse d'apparition des différents groupes primitifs. Cette apparition est liée assez exactement au développement des différents segments de l'animal. Ainsi chez les Brachyours où la queue s'atrophie de bonne heure, le groupe caudal manque. Les auteurs pensent que la disposition des centres du système primaire étudiés chez les larves peut avoir une grande valeur au point de vue systématique.

Ces observations, qui sont d'une grande exactitude, peuvent être vérifiées si l'on a à sa disposition une série de larves de différents âges. J'ai pu les suivre sur des embryons de *Pisetaenion* et de *Pinnotherea pisum*, où l'évolution des chromatophores est tout à fait comparable. Elles permettent de se

rendre compte comment le système pigmentaire si simple de l'embryon peut aboutir à la disposition compliquée de l'adulte où l'on ne distingue plus aucun ordre apparent.

KEEBLE et GAMBLE comprennent dans leurs systèmes de chromatophores indistinctement les chromatophores des deux séries chimiques que j'étudierai plus loin. C'est qu'en effet les cellules contenant ces différentes espèces pigmentaires semblent bien avoir même origine et même évolution au point de vue strictement anatomique. On peut les rencontrer ensemble, métamériquement disposées chez un jeune embryon encore contenu dans les membranes de l'œuf (Pl. II. Fig. 9). Leur chimisme est différent et leur destinée biologique devient par la suite divergente. Toutefois l'élaboration de pigment rouge par des cellules mésenchymateuses est bien postérieure chez la larve à celle des autres pigments. Elle apparaît seulement quand on distingue déjà la forme du corps dans le blastoderme.

CHAPITRE II

Description Morphologique de la Cellule pigmentaire

Sommaire. — Description des cellules pigmentaires chez les Schizopodes et les Décapodes. Caractéristiques morphologiques de la cellule pigmentaire déduites de cette description. Stérilité de la pure morphologie.

Je considère comme assez secondaire les discussions qui se sont livrées au sujet de la morphologie pure de la cellule pigmentaire. Cependant, comme elles représentent la presque totalité des travaux qui ont été faits histologiquement sur les pigments des Crustacés, j'aurais craint d'être incomplet en les omettant.

KEEBLE et GAMBLE ont étudié en même temps la cellule pigmentaire chez les Schizopodes et chez les Décapodes. Ces deux ordres étant très voisins, je crois bon de rapporter les observations qu'ils ont publiées pour l'un et l'autre.

Schizopodes. — *Mysidés.* — KEEBLE et GAMBLE, dans une série de travaux plutôt anatomiques que cytologiques, ont étudié les chromatophores des Mysidés (1904-1906). Les branches des chromatophores atteignent $2 \frac{m}{m}$. Elles se subdivisent en ramifications luxuriantes qui forment des étuis aux organes profonds et des arborisations terminales dans la peau. Les chromatophores sont des organes complexes. D'après ces auteurs, leur structure varie suivant leur position dans le corps. Il en existerait trois types : 1° Dans le

telson et les lobes de la queue, le chromatophore présente un centre formé d'un sac sphérique de un ou deux millimètres et percé par un nombre de cellules variant de six à huit suivant l'âge du chromatophore. A l'intérieur, chaque cellule se prolonge par des fibrilles. Le noyau est situé dans la partie centrale. Le sac lui-même est un épithélium aplati et contient le pigment dans une matrice claire ou granuleuse.

2° Sur les lamelles incubatrices, chaque chromatophore est composé d'un grand centre lenticulaire et de branches très développées. La portion centrale est cytoplasmique, fine et granuleuse et légèrement fibrillaire. Elle est parfaitement continue avec les branches. Au point d'origine de celle-ci il y a un petit groupe de noyaux. Le protoplasma des branches est nettement fibrillaire à l'état frais et dans les préparations conservées. Le chromatophore est limité par une membrane distincte qui se continue autour des branches.

3° Le dernier type de structure est réalisé dans les chromatophores neuraux et caudaux. Ce sont des cellules unies au centre l'une avec l'autre et avec une masse protoplasmique où est souvent présent un corps plus réfringent et coloré. Ce corps n'est pas un noyau, mais probablement un produit de l'activité du protoplasma qui l'entoure. Dans ces chromatophores, les noyaux sont plus centraux que dans les autres types, les branches sont plus fortes et plus nombreuses. Le centre atteint une plus grande taille et une plus grande capacité pour produire le pigment et le mettre en réserve.

Cette distinction de types suivant l'emplacement des chromatophores paraît tout à fait artificielle et DEGNER (1912) s'élève avec raison contre une telle description. Il ne trouve pas de différences dans la structure des chromatophores des différentes régions chez *Macromysis* (*Praunus*). D'après lui, les chromatophores représentent un syncytium entouré d'une membrane que l'on peut suivre sur les prolongements ou chromorhizes. La masse pigmentaire se trouve en mottes, sans membrane. La position des noyaux est différente suivant la rétraction ou l'expansion du pigment. En expansion, ils se trouvent à la base des prolongements, et dans l'intérieur des mottes, quand le pigment est retiré. Le nombre des

noyaux augmente avec l'âge. On voit des figures de division fréquemment sur des adultes. DEGNER considère la membrane comme un produit des chromatophores. Les chromorhizes présentent une structure fibrillaire nette que DEGNER voit disparaître dans le pelotonnement complet, et réapparaître seulement pendant l'expansion. Pour FUCHS (1913), cette opinion n'est pas démontrée. DEGNER déclare aussi que dans les chromatophores complètement rétractés on ne voit le contour des prolongements que lorsque des traces de pigment restent en arrière. Il tient néanmoins pour la configuration préformée des chromorhizes. BAUER (1912) a décrit après traitement à l'osmium un système de fibres dans les gros prolongements des chromatophores, même quand le pigment est rétracté. DEGNER n'a jamais observé dans l'état d'expansion la réunion directe de deux chromatophores voisins.

DÉCAPODES. — Les genres suivants ont été étudiés: *Hippolyte* (KEEBLE et GAMBLE 1904-1906), *Crangon* (POUCHET, 1876; DEGNER, 1912; KEEBLE et GAMBLE), *Palæmon* (POUCHET, DOFLEIN, 1904-1910; FREHLICH, 1910; DEGNER), *Homarus* (POUCHET), *Pandalus* (FRANZ, 1908-1910).

KEEBLE et GAMBLE donnent dans les deux travaux où ils étudient les chromatophores d'HIPPOLYTE des descriptions sensiblement différentes. Comme pour *Macromysis*, ils admettent d'abord que les chromatophores d'une même espèce sont construits différemment suivant les régions, mais rien ne vient confirmer ces données dans leurs derniers travaux. Leur manière de concevoir le chromatophore peut se ramener à la description suivante. Les chromatophores sont toujours polychromatiques, c'est-à-dire de plusieurs couleurs. Ce sont des masses polynucléaires étoilées. Leur partie centrale est limitée par une membrane. Les branches sont fibrillées et ont aussi une enveloppe qui leur donne une apparence tubulaire. A la base de chaque branche existent un ou plusieurs noyaux. A l'intérieur de l'enveloppe centrale on voit aussi des noyaux périphériques aplatis. Chaque pigment a ses branches propres et sa part du centre. Le chromatophore paraît ainsi formé d'une série de compar-

timents correspondant à autant de cellules. Le cytoplasma de ces cellules est différencié d'une façon qui n'est pas habituelle chez les animaux en un ectoplasma très réfringent qui forme un mur autour de l'endoplasma liquide. Quand le chromatophore s'étend, l'endoplasma contenant le pigment s'écoule de la cellule centrale dans la cellule branche. On voit parfois les branches des chromatophores s'unir avec d'autres cellules branchues du tissu conjonctif. Les chromatophores de *Crangon* sont essentiellement construits comme ceux d'Hippolyte. Ils se distinguent par leur taille considérable.

DEGNER admet aussi que les différents pigments se trouvent dans des parties des chromatophores nettement séparées les unes des autres. POUCHET n'avait pas observé de polychromasie. Il pensait qu'il s'agissait de cellules pigmentaires voisines entrant en contact.

DOFLEIN a étudié avec soin les chromatophores de *Palæmon* (*Leander*). Leur taille est variable : les uns sont visibles à l'œil nu, d'autres aux plus forts grossissements. Ce sont des éléments branchus ressemblant à des rhizopodes. La masse du pigment peut être concentrée en une boule centrale. De ce centre partent les chromorhizes tantôt nombreux et fins, tantôt peu nombreux et gros et qui paraissent préformés. Ils se renflent souvent en tubercules à leur extrémité. Déjà à l'état frais DOFLEIN reconnaît la présence d'un squelette axial, composé de bâtonnets très réfringents contre lesquels la matière colorante se serre. FRANZ a retrouvé ce squelette de bâtonnets chez *Pandalus*. Il y est disposé en rayons dans les prolongements, mais forme des cases dans le corps cellulaire. Dans des chromatophores blancs, DOFLEIN ne retrouve pas la striation longitudinale ; il croit qu'elle est masquée par les masses de pigment.

De cet exposé morphologique touffu, il est possible de dégager un certain nombre de points généraux.

La cellule pigmentaire se montre, à l'état d'expansion, comme un élément possédant d'abondantes ramifications ou chromorhizes. Elle est considérée tantôt comme dépourvue de membrane et douée de mouvements amiboïdes (POUCHET),

tantôt au contraire comme présentant une charpente fixe étayée par un système de trabécules à l'intérieur duquel les granules pigmentaires sont mobiles (DEGNER, FRANZ, DOFLEIN). Le chromatophore est fréquemment pourvu de plusieurs noyaux. Il représente alors une véritable cellule géante ou la réunion de plusieurs éléments cellulaires simples. Un autre point de litige est de savoir si un chromatophore peut contenir à la fois plusieurs espèces pigmentaires, s'il peut être polychromatique. Cet avis est partagé par la majorité des observateurs, dont certains admettent toutefois que les différents pigments sont séparés par des cloisons. POUCHET à peu près seul soutient qu'il s'agit de cellules différentes devenues contiguës.

Il n'y a aucun intérêt à s'attarder à la discussion morphologique de ces divers points. Les descriptions si complexes de KEEBLE et GAMBLE sont vaines et inutiles. Un tel luxe de détails est stérile. Les chromatophores, à quelque espèce qu'ils appartiennent, ont une origine analogue; ce sont, nous l'avons vu, des cellules mésenchymateuses élaborant des enclaves cytoplasmiques. Ce qui doit caractériser seul un chromatophore, c'est le pigment qu'il produit. C'est l'étude histochimique des pigments qui tranchera ces problèmes que la morphologie laisse insolubles. Ils s'éclaireront alors d'un jour tout nouveau et l'on constatera que l'opposition entre les manières de voir n'est souvent qu'apparente.

La forme d'un chromatophore est surbordonnée à la nature de son pigment. La cellule adipeuse prend la forme sphérique du globule de graisse qui a envahi son cytoplasma, forme déterminée par les lois de la tension superficielle. De même la forme du chromatophore et de ses chromorhizes est déterminée par la nature du pigment qu'il contient. Les autres caractères morphologiques, comme le nombre des noyaux, les dimensions des cellules, sont également sous la dépendance directe du métabolisme du produit pigmentaire et s'expliqueront logiquement quand nous connaîtrons ce métabolisme. Il sera par exemple tout naturel de trouver dans un même chromatophore des pigments ayant une parenté chimique, mais de couleurs différentes et la poly-

chronologie, dans ce cas, sera vraie. Tandis que, suivant la manière de voir de POUCHET, elle ne pourra s'expliquer que par la contiguité de chromatophores différents, quand il s'agira de substances pigmentaires ayant des métabolismes différents. Enfin, même au point de vue morphologique, l'étude de la formation du pigment dans le chromatophore a été complètement négligée. Je montrerai que, ce qui caractérise une cellule pigmentaire en formation, c'est avant tout qu'elle se présente sous l'aspect d'une cellule en état de sécrétion ⁽¹⁾.

(1) J'emploie le terme sécrétion dans le sens qu'on lui donne en histologie et qui est du reste conforme à l'étymologie. Une cellule qui sécrète sépare du milieu où elle est, des éléments élaborés ensuite dans son cytoplasma. Cette séparation et cette élaboration, rigoureusement déterminées par les lois physico-chimiques, constituent le phénomène histologique de la sécrétion.

CHAPITRE III

Nature et Classification des Pigments

Sommaire. — Revue des travaux basée sur les caractères extérieurs (couleur, état physique) A quelle classification ont abouti mes observations personnelles.

Jusqu'à présent, j'ai envisagé la cellule pigmentaire, dans son origine et sa structure, sans m'occuper de son contenu spécifique, du pigment lui-même. J'ai laissé pressentir à la fin du dernier chapitre quelle était l'importance de l'étude de cette question. Elle représente la partie fondamentale de mon travail, mais a été au contraire généralement négligée par les auteurs qui ont étudié les chromatophores des Crustacés comme du reste ceux des autres animaux.

A lire les travaux qui ont déjà paru sur les pigments tégumentaires, on retire l'impression que la confusion la plus grande règne dans la connaissance de leur nature. La raison de cette confusion est à mon avis facile à découvrir. D'une part on trouve un nombre assez considérable de descriptions à caractère morphologique, d'autre part un nombre beaucoup plus restreint de recherches d'ordre chimique. Mais aucun effort n'a été tenté pour établir un trait d'union, une liaison entre ces deux genres de travaux. Et c'est pourtant là, comme je l'ai exposé d'une manière plus générale au début de mon étude, que l'on trouvera la solution du problème. Les histologistes sont arrivés à localiser les pigments mais ne se sont occupés que secondairement de leur nature, se contentant la plupart du temps de les classer d'après leurs caractères extérieurs : la couleur ou l'état physique. Ce sont là des

caractères faciles à observer, et il est naturel qu'ils aient d'abord frappé l'esprit et qu'on les ait utilisés. Comme dans toute autre partie des sciences d'observation il a même fallu, à l'origine, établir des catégories d'après ces caractères. Mais cette classification, seule opération possible au début, ne peut être qu'un instrument de travail transitoire. Il y a mieux à faire. Il faut s'efforcer de connaître l'essence même des produits pigmentaires, il faut chercher s'il existe des relations entre ceux que l'on observe chez un même animal et quelles sont ces relations. Par là une telle question aura une portée véritablement biologique en nous conduisant à la connaissance du métabolisme cellulaire.

Ainsi c'est sur les caractères chimiques des pigments qu'il faudra se baser pour les grouper et les étudier. Mais si nous nous limitons à des recherches d'ordre purement chimique, nous tomberions dans un autre défaut. Lorsqu'on traite en bloc par exemple la carapace et l'hypoderme d'un Crustacé, pour en retirer au moyen des solvants appropriés un pigment dont on étudie les propriétés chimiques, on fait une œuvre indispensable, la seule qui soit possible pour connaître la composition du pigment. Mais on ignore d'où vient ce pigment, où il se forme, sous quel aspect il apparaît et il existe dans les tissus. Le contrôle du microscope est indispensable et l'œuvre ne pourra être parfaite que lorsque l'on aura réalisé *in situ* les réactions principales obtenues *in vitro*. Ainsi la chimie seule, pas plus que l'histologie ne peut résoudre le problème. Seule une méthode d'investigation menée parallèlement sera féconde.

C'est ce que je me suis efforcé de réaliser dans mes recherches. Pour leur servir d'introduction, je vais dans ce chapitre exposer synthétiquement les résultats obtenus par les auteurs qui se sont occupés avant moi de répartir en espèces les pigments des Crustacés. Mon exposé personnel sera du même coup allégé, en m'évitant de revenir à ce moment sur les opinions de mes devanciers, puisque la base dont je partirai sera nettement différente. J'indiquerai à la fin de ce chapitre comment j'ai acquis les données qui m'ont conduit à cette base.

Couleur. — La couleur a été le critérium principalement utilisé pour séparer les substances pigmentaires. FUCHS (1913), dans sa revue générale, les répartit suivant le même caractère.

Pigment rouge. — Comme chez tous les habitants des mers, il est très largement répandu, aussi a-t-il fait l'objet de nombreux travaux. Chez les Macroures, KEEBLE et GAMBLE (1904), décrivent beaucoup de pigment rouge chez les individus vieux et peu chez les jeunes. Un objet favori pour cette étude a été le genre *Palæmon*. POUCHET décrit plusieurs modifications du pigment : à l'état dissous il est rouge ou rose, en grains il est brun. KEEBLE et GAMBLE, DOFLEIN (1910) remarquent que le pigment rouge est rarement à l'état pur dans un chromatophore. DOFLEIN conclut qu'en fait les chromatophores se comportent toujours comme polychromatiques. Cette question a été vue dans le chapitre précédent. Dans les chromatophores rouge pur, la matière colorante est en gouttes ou en mottes. Elle est moins liquide que la jaune. La masse de la matière colorante est réunie en cordons homogènes. Chez *Leander (Palæmon) xiphias*, le pigment rouge est particulièrement épais et il apparaît noir par transparence. D'après FRÖHLICH (1910), autour des chromatophores rouges de *Palæmon*, il existe une zone jaune qui, au moins d'après les images de cet auteur, ne présente pas de structure. MEGUSAR (1912) admet que le pigment rouge est transformé à la lumière en jaune. Je reviendrai sur cette observation que j'ai moi-même vérifiée. Chez *Crangon*, POUCHET (1876), KEEBLE et GAMBLE remarquent que les chromatophores rouges sont moins nombreux que les jaunes et les violets. Le pigment rouge des *Astacidés* est connu depuis longtemps. FOCILLON (1851), LEREBoullet (1851), POUCHET ont étudié ce pigment chez *Astacus* et *Homarus*. D'après POUCHET, les chromatophores rouges contiennent un pigment dissous ou très finement granuleux. Le pigment rouge a été cité chez *Galathea* (KEEBLE et GAMBLE), chez *Carcinus* (FOCILLON, KEEBLE et GAMBLE), chez *Portunus* (KEEBLE et GAMBLE).

Pigment jaune. — Les auteurs suivants en ont décrit chez différentes espèces : *Mysidés*, (KEEBLE et GAMBLE), *Hippolyte*, *Palæmon*, *Crangon* (POUCHET, KEEBLE et GAMBLE), *Pandalus*

(FRANZ), *Homarus* (POUCHET), *Galathea*, *Carcinus* et *Portunus* (KEEBLE et GAMBLE), *Pagurus* (POUCHET). Plus que toute autre cette catégorie du pigment jaune est hétérogène. Sous une coloration analogue se trouvent des substances de composition chimique tout-à-fait différente. De là viennent les divergences des auteurs qui décrivent tantôt en grains, tantôt en gouttes à l'état liquide des pigments qui n'ont de commun que la teinte.

Pigment bleu. — Ce pigment a été mieux étudié. On s'est rendu compte qu'il avait des rapports avec le pigment rouge et on a essayé de les saisir. Il a été décrit tour à tour diffus ou en grains. FOCILLON l'a vu comme un pigment cristallin qui devient rouge par les acides. POUCHET a observé des cristaux analogues et les a appelés cœrulins. KEEBLE et GAMBLE ont étudié le pigment bleu nocturne d'*Hippo'yte*. POUCHET et DOFLEIN ont vu des gouttes et des mottes diverses de pigment bleu en dehors des chromatophores. Le pigment bleu diffus qui est présent dans la carapace et l'hypoderme chez *Homarus*, *Astacus*, *Palæmon* a été observé de longue date. Le pigment bleu manque complètement chez *Crangon* (POUCHET).

Pigment vert. — Il résulte toujours du mélange de jaune et de bleu. LEREBoullet signale chez *Astacus* entre les mailles du réseau des chromatophores rouges de très petites taches vertes qui se présentent au fort grossissement comme des cellules étoilées du type ordinaire des cellules pigmentaires. Ces éléments n'ont pas été décrits par d'autres auteurs et je ne les ai moi-même jamais retrouvés.

Pigment blanc. — Il a été décrit à l'état pur ou mélangé, chez *Macromysis* (KEEBLE et GAMBLE, DEGNER), chez *Palæmon* (DOFLEIN, DEGNER, BAUER, MEGUSAR). DOFLEIN le trouve très réfringent et le tient pour de la chaux. Mes observations ne confirment pas cette vue.

Pigments brun et noir. — Ils ont été signalés par KEEBLE et GAMBLE chez les *Mysidés* et chez *Carcinus*. Le pigment est en grains très fins, répandu dans les chromatophores. DOFLEIN qui en décrit chez *Palæmon*, où jemontrerais qu'il n'en existe jamais, semble avoir fait une confusion avec le pigment

rouge qui, accumulé dans les chromatophores en rétraction a un aspect noir par transparence à l'état frais.

On a signalé aussi un pigment violet. POUCHET ainsi que KEEBLE et GAMBLE en ont décrit chez *Crangon*.

J'arrête là cette énumération. Il serait fastidieux de la pousser dans plus de détails. Je pense avoir suffisamment montré combien la connaissance des pigments des *Crustacés* reposant sur un caractère comme la couleur, était superficielle.

POUCHET a essayé d'établir des liens entre les espèces pigmentaires énumérées ci-dessus. Il établit trois séries : la première comprend les colorations noires et brunes qu'il attribue à une mélanine ; la seconde qu'il appelle série xanthique réunit les pigments rouge, orangé ou jaune se présentant soit à l'état grenu, soit à l'état dissous et contenus dans des chromoblastes. Enfin la troisième série ou série cyanique comprend des pigments solubles appartenant tous à la partie la plus réfrangible du spectre. On ne trouve jamais cette matière bleue dans des chromoblastes, exception faite pour le pigment violet de *Crangon*. C'est une teinture qui imprègne les tissus, la carapace. Sa destruction par la chaleur ou les acides fait réparaître les pigments rouges.

DEGNER s'est efforcé de sérier les pigments suivant leur état physique. Il a formé trois classes. Une première comprend les pigments liquides quelle qu'en soit la couleur. Une seconde a des caractères mixtes, des grains baignent dans une masse liquide différemment colorée. La troisième classe renferme les pigments nettement et uniquement granuleux. Cette division basée sur un caractère également morphologique est tout aussi artificielle. FUCHS met en doute l'existence de la deuxième catégorie. Pour ma part, je ferai remarquer que la zooérythrine qui se présente d'abord sous un aspect granuleux finit par confluence de tous les grains par former des flaques absolument homogènes. Ce fait détruit les cloisons qui séparent les catégories de DEGNER.

Dans leur second mémoire sur les couleurs de Crustacés (1906) KEEBLE et GAMBLE s'adressent à un autre caractère physique, un caractère optique, et classent les pigments en

pigments absorbants qui sont rouge, jaune, brun, violet ou bleu et les pigments réfléchissants jaune, blanc verdâtre ou bleuâtre.

Les autres travaux sur la nature des pigments tégumentaires des Crustacés, sont d'ordre purement chimique et aucun histologiste n'a eu l'idée de les mettre à profit pour une étude rationnelle des pigments. Ils ne concernent du reste que les pigments bleu et rouge qui donnent leurs couleurs les plus apparentes aux crustacés. Les autres variétés de pigments n'ont pas attiré l'attention des chimistes et il y a là une lacune. Je ferai l'historique de ces recherches chimiques à l'occasion de l'exposé de mes résultats.

Pour m'efforcer à mon tour de sérier les pigments et de pénétrer dans leur constitution, je me suis adressé à une série de types courants de Crustacés. Ayant reconnu que les divers critères utilisés par d'autres auteurs et exposés au cours de ce chapitre étaient insuffisants, j'ai poussé chez eux à la fois histologiquement et chimiquement une investigation avancée. M'élevant du particulier au général j'ai pu, en coordonnant mes résultats, ramener à deux grandes séries bio-chimiques tous les pigments des Crustacés décapodes.

Il existe constamment chez ces Invertébrés un pigment blanc-jaunâtre, le pigment réfléchissant de KEEBLE et GAMBLE. Ce pigment vu par lumière transmise a une couleur bistre et c'est sous ce nom que je l'ai désigné dans mes premières notes. Ce pigment est souvent accompagné d'un pigment mélanique, noir ou brun, et ce sera une de mes conclusions que de prouver que cette mélanine se forme au dépens du premier pigment. Ces deux pigments forment ainsi un premier groupe, à la fois biologique et chimique, caractérisé parce qu'ils proviennent de la désintégration des matières protéiques et que l'azote en est par conséquent la base. Je l'appellerai : *Série Azotée d'origine protéique*. Le pigment rouge constituera une seconde catégorie chimique avec les différents dérivés dus notamment à sa combinaison avec une albumine. Pour rappeler le pigment qui est le point de départ de cette série, je l'appellerai : *Série de la Zooérythrine ou des composés carotinoïdes*.

Cette classification peut, à mon avis, être étendue à l'aide de tous les moyens d'étude que j'exposerai, à l'investigation des différents pigments animaux. Il convient à ce propos de remarquer qu'une série comprenant des corps puriques, provenant de la désintégration des nucléines et largement représentée chez les vertébrés inférieurs, n'existe pas chez les Crustacés décapodes (1).

Avant d'exposer en détails mes recherches histochimiques dans les deux séries pigmentaires que je viens de distinguer chez les Crustacés, j'indiquerai dans un chapitre spécial le matériel sur lequel ces recherches ont porté et les méthodes qui m'ont permis de les conduire.

- (1) La série purique paraît être représentée en revanche chez les Isopodes.
Je compte revenir sur ce point dans des recherches ultérieures
-

CHAPITRE IV

Technique et matériel

Technique. — Il résulte des idées exposées dans l'introduction de ce travail que la base de mes recherches a été la collaboration de méthodes chimiques et de méthodes histologiques. J'ai indiqué que cette collaboration pouvait, d'une manière générale, revêtir deux aspects. Je les ai réalisés ainsi qu'il suit.

Investigations histologique et chimique parallèles

A l'aide du microscope, j'ai étudié la forme des chromatophores, leur situation et leur répartition, l'évolution de leurs enclaves pigmentaires. La chimie me permettait concurremment de rechercher, qualitativement et quantitativement, la structure chimique de ces pigments et leurs réactions, en isolant *in vitro* par les méthodes convenables les produits du métabolisme mis en question. Je créais de cette façon une série de stades dont l'histologie donnait l'image et la chimie la composition.

Les méthodes chimiques que j'ai employées sont les méthodes en usage en chimie organique et en chimie biologique avec quelques adaptations selon les circonstances. Je les indiquerai avec détails, chaque fois que j'exposerai les opérations chimiques auxquelles j'ai laissé une très large part.

Pour ce qui est des méthodes histologistes, je dois exposer ici les principes qui m'ont guidé.

Les techniques courantes d'inclusion et de coloration ont été reléguées par moi au second plan. Une étude des pigments

qui serait faite avec de telles techniques n'aurait aucune valeur. La plus grande partie des substances pigmentaires disparaissent, dissoutes ou détruites qu'elles sont, au cours des traitements réclamés par ces méthodes. Le pigment noir, connu sous le nom de mélanine, résiste seul dans ces conditions; aussi, est-il généralement le seul décrit par les morphologistes. Et ce qui est vrai pour les pigments l'est certainement pour bien d'autres substances. Depuis quelques années, on s'en est rendu compte, particulièrement en ce qui concerne les lipoïdes, qu'à l'instigation des chimistes, les histologistes se sont efforcés de caractériser dans les tissus. Il y a là un progrès considérable. Mais si les lipoïdes sont beaucoup, ils ne sont pas tout. A côté de ces substances solubles dans les corps gras et leurs solvants, il y a toute la série des produits de désassimilation des protéiques, pour la plupart solubles tout simplement dans l'eau, et que l'histologiste ignore parce qu'il ne les voit pas.

Plusieurs conclusions se dégagent de ces faits et je les mettrai à profit au cours de mon travail.

1° On doit réhabiliter l'examen à l'état frais et lui faire occuper le premier rang dans toute recherche histologique. Je lui fais tenir une place prépondérante. Il est vrai que le matériel que j'étudiais s'y prêtait particulièrement. Les chromatophores contenus dans la lame mince et translucide formée par l'hypoderme sont d'une observation facile. Pour des tissus formant des organes compacts, il faudrait avoir recours à des dissociations ou à des coupes par congélation sans fixation préalable.

2° On ne doit jamais faire usage d'une méthode unilatérale. Une méthode qui montre bien un objet est déplorable pour un autre. Ainsi l'alcool qui seul serait capable de conserver les acides aminés ou les peptones donne une mauvaise fixation du noyau et détruit en grande partie les lipoïdes. Des exemples de ce genre sont courants. Il faut lorsque on étudie un objet, le soumettre successivement à une série de techniques et bien se garder de le voir sous un seul jour. C'était déjà le principe des méthodes convergentes de RENAULT.

L'inclusion à la paraffine et la coloration de l'hématoxyline peuvent et doivent apporter leur contribution dans les tentatives que nous faisons pour nous représenter la structure et le métabolisme cellulaires et j'ai eu recours à elles pour compléter ma documentation. Mais, je le répète, elles ne doivent être qu'un des outils que l'histologiste tient à sa disposition et non le plus important.

Recherche histochimique proprement dite

C'est l'étude au sein des tissus des propriétés chimiques des éléments histologiques. Elle est à l'origine la réalisation sur ces derniers des réactions observées *in vitro* sur la substance chimiquement isolée. Elle est précieuse en permettant une localisation exacte. L'histochimie est appelée par elle-même à un grand développement et elle doit constituer quelque jour un des plus importants chapitres de l'histologie telle que je la conçois. Il est en effet des constituants chimiques des tissus ou des cellules que l'on n'arrivera pas à isoler par les méthodes chimiques ordinaires et cela pour trois raisons :

1° Ces substances sont en trop faible quantité et l'on ne peut pas toujours disposer de grandes masses du tissu étudié ;

2° On n'arrive pas à les séparer *in vitro* d'autres substances distinctes histologiquement mais extraites en même temps en raison de leurs caractères de solubilité ;

3° On risque de les détruire par les méthodes d'extraction.

L'histologiste, au contraire, voit ces substances *in situ*. Il peut étudier leurs caractères, leurs réactions à l'endroit même où il les trouve. Dans son étude sur le protoplasma et les sucs cellulaires, BORTAZZI (1911) se range à cette manière de voir. « La détermination quantitative d'un corps, dit-il, apprend seulement qu'il se trouve en quantité donnée dans une certaine espèce de cellule, mais elle ne dit pas si c'est un constituant du protoplasma ou simplement s'il appartient au matériel paraplasmatique déposé dans le corps cellulaire,

Dans de pareils cas c'est la recherche microscopique et micro-chimique qui donnera de précieuses conclusions sur la répartition et l'état libre ou combiné d'une substance chimique donnée dans le cytoplasma ».

Le chimiste étudie les composés en abstraction, l'histo-chimiste seul est à même de pouvoir les étudier de façon concrète dans leur milieu.

La difficulté de l'application réside dans le choix des méthodes à utiliser. Elles doivent répondre à des conditions que PRENANT (1910) a définies. MANN (1902) avait fait dans ce sens une tentative très heureuse en groupant toutes les techniques histochimiques éparses dans les travaux histologiques. De mon côté je me suis astreint, après avoir étudié chaque pigment, à mettre au point une méthode d'identification histochimique, aussi précise que possible et rigoureusement raisonnée d'après les réactions *in vitro*.

Matériel

Mon intention primitive était de faire une étude des pigments portant sur l'ensemble de la classe des Crustacés, J'ai éliminé les Crustacés inférieurs et je me suis cantonné aux Décapodes, c'est-à-dire à l'ordre que l'on considère comme le plus élevé en organisation. La raison principale qui a motivé mon choix est une raison pratique. Il est dans l'esprit même de mon travail, comme je viens encore de l'indiquer, de ne procéder à aucun examen histologique, à aucune constatation morphologique sans leur apporter le concours et le contrôle d'une recherche chimique. Il est bien évident que pour atteindre ce but il faut pouvoir isoler facilement et en quantité suffisante les régions à étudier, opération que l'on ne peut pratiquer à l'abri de toute critique que sur d'assez gros animaux. L'ordre des Décapodes est le seul à renfermer des espèces répondant à ce desideratum. Ces espèces sont de plus pour la plupart très faciles à se procurer.

En étendant mon champ d'investigation à d'autres ordres, j'aurais été arrêté par ce fait que la petite taille de certaines

espèces, seules à représenter parfois un ordre, m'aurait interdit toute recherche chimique. Seule une méthode micro-chimique aurait pu être utilisée avec elles et je me trouvais en face d'une pétition de principe, puisque mon but est précisément de mettre au point cette méthode micro-chimique pour l'étude des pigments et de la raisonner par des constatations *in vitro*.

Un autre avantage présenté par l'ordre des Décapodes est la constance et l'homogénéité de la pigmentation chez ses différents représentants, ce qui m'a permis de procéder avec ordre et méthode. Chez les Entomostracés, comme chez les Edriophthalmes, la pigmentation est au contraire d'une variabilité extrême, non seulement d'un ordre à l'autre, mais également d'un genre à l'autre parmi les représentants d'un ordre. Les chromatophores si constants chez les Décapodes n'existent pas chez beaucoup, certaines espèces étant dépourvues de toute coloration, chez d'autres cette dernière étant due à des causes autres que la présence de pigment dans les téguments. Ces différents cas doivent former le sujet d'une étude différente.

Me limitant aux seuls Décapodes, mon travail gagnera en précision ce qu'il perdra en extension. Tel qu'il est, il constitue un ensemble très homogène autant par l'objet et les conclusions que par les procédés mis en œuvre.

Je donne ci-après la nomenclature des espèces que j'ai étudiées, groupées d'après leurs affinités zoologiques.

Les espèces d'eau douce ont été étudiées soit à Paris, soit dans le Lot; les espèces marines, exception faite pour celles qui voyagent facilement, comme le *Carcinus* ou le *Cancer*, ont été étudiées au laboratoire maritime de Luc-sur-Mer, à l'état vivant, sitôt après avoir été pêchées, c'est-à-dire dans les meilleures conditions possibles.

I. — BRACHYOURS

- 1° *Maidi*. — *Stenorhynchus phalangium* (Penn.)
» *longirostris* Latr.
Pisa tetraodon Leach.

- Ebalia tuberosa* (Penn.)
Hyas araneus (Linn.)
Inachus Dorsettensis (Penn.)
2° *Canceridi*. — *Cancer* (*Platycarcinus*) *pagurus* L.
Pilumnus hirtellus L.
3° *Portunidi*. — *Carcinus mœnas* (Penn.)
Portunus puber (Linné)
» *depurator* Leach.
» *arcuatus* Leach.
4° *Pinnotheridi*. — *Pinnotheres pisum* (Penn.)

II. — ANOMOURES

- 1° *Dromidi*. — *Dromia vulgaris* Milne-Edwards.
2° *Paguridi*. — *Eupagurus bernahrdus* (Linn.)
Pagurus prideauxi Leach.
3° *Porcellanidi*. — *Porcellana platychèles* (Penn.)
» *longicornis* (Penn.)
4° *Galatheidi*. — *Galathea strigosa* L.
» *squamifera* Leach.
» *nexa* Embl.

III. — MACROURES

- 1° *Scyllaridi*. — *Scyllarus arctus* (L.), provenant de
la Méditerranée.
2° *Palinuridi*. — *Palinurus vulgaris* Latreille.
3° *Astacidi*. — *Astacus fluviatilis* (Rond.) var. *nobilis*
et var. *torrentium*.
Homarus vulgaris Milne-Edwards.
Nephrops norvegicus (L.)
4° *Palaemonidi*. — *Crangon vulgaris* Fabr.
» *spinosus* Fabr.
Nika edulis Risso
Athanas nitescens (Montagu).
Hippolyte varians Leach.
Palaemon serratus (Penn.)

J'ai utilisé pour mes déterminations les *Suites à Buffon* de MILNE-EDWARDS (Crustacés-1840), l'*History of the british stalk-eyed Crustacea* de BELL (1853), et l'article de SCHLEGEL sur les Décapodes de Roscoff (*Mémoires de la Société zool. de France-1911*).

CHAPITRE V

Série azotée d'origine protéique.

Sommaire. — Définition. Distinction des Crustacés Décapodes à mélanine et sans mélanine.

1^{re} Partie. — Décapodes à mélanine.

A. — Pigment amino-acide. 1^o Historique. Technique spéciale ; 2^o Répartition ; 3^o Histologie des chromatophores ; 4^o Morphologie du produit pigmentaire ; 5^o Nature du pigment ; 6^o Applications histochimiques ; 7^o Variations chez les Décapodes mélaniques.

B. — Mélanine. 1^o Méthodes d'étude ; 2^o Répartition ; 3^o Histologie ; 4^o Morphologie du produit pigmentaire ; 5^o Chimie du pigment ; 6^o Applications histochimiques ; 7^o Variations chez les Décapodes.

C. — Formation de la mélanine. 1^o Exposé des Théories ; La tyrosinase. Son existence chez les Crustacés. Etude de son action ; 2^o Origine de la mélanine chez les Décapodes aux dépens du pigment amino-acide ; 3^o Etude critique *in vivo* de la mélanogène et de ses facteurs.

2^{me} Partie. — Décapodes sans mélanine.

Etude du pigment amino-acide des Crustacés sans mélanine. Explication de la non formation de mélanine.

J'ai réuni les pigments étudiés dans ce chapitre sous le titre général de Série azotée d'origine protéique. J'entends par ces qualificatifs que ces pigments sont caractérisés, à la différence de ceux de la série de la zooérythrine, par la présence constante d'azote dans la structure de leur molécule propre et que cet azote existe sous la même forme que dans les produits d'hydrolyse des matières protéiques dont ils doivent être considérés comme faisant partie. Ces pigments sont ainsi distingués d'autres pigments également azotés, mais dont l'azote provient de la dégradation de nucléines et qui sont les pigments puriques. J'ai, du reste, fait remarquer que cette *série purique* n'existait pas chez les Crustacés Décapodes et, au cours de ce travail, j'emploierai par abréviation le terme série azotée sans qu'il y ait de confusion possible. Mais chez un grand nombre d'animaux les deux séries azotées existent côte à côte, l'une paraissant un des termes de l'évolution de la substance protoplasmique, l'autre de la substance nucléaire. Aussi convient-il que leur définition soit précise.

Les pigments azotés d'origine protéique forment chez les Crustacés Décapodes un ensemble fort homogène biologiquement, quoique comprenant des termes qui peuvent paraître assez différents à un examen superficiel. Leur série comprend un terme commun à tous les Décapodes. C'est le pigment réfringent jaunâtre dont j'ai déjà eu l'occasion de parler. Ce pigment présente d'ailleurs des différences dans sa composition chimique et son évolution, puisqu'il aboutit dans un groupe de Décapodes à la formation de mélanine, alors que dans un second groupe il n'aboutit jamais à cette transformation. De là la répartition en deux groupes des Crustacés que

j'étudie, selon la présence ou l'absence de mélanine. La série azotée doit être étudiée séparément dans ces deux groupes. Elle comprend deux termes chez les Décapodes mélaniques et un seul chez les non mélaniques.

Le nom de pigment est généralement réservé aux substances de l'organisme naturellement colorées. Aussi pourrait-on s'étonner de me voir employer les mots pigment amino-acide, ce composé étant toujours d'une teinte très pâle, parfois blanche. A mon avis, on doit le considérer comme un pigment au même titre que des composés de teinte différente. Il joue, comme ces derniers, un rôle dans la coloration des téguments et évolue comme eux dans des éléments qui sont de véritables cellules pigmentaires. Il est du reste d'un usage courant, surtout en ce qui concerne les pigments uriques, de parler de leucophores et de pigment blanc.

1^{re} Partie. — Décapodes à mélanine.

Répartition zoologique. — La mélanine se rencontre d'une manière constante chez les Crustacés Décapodes Brachyours. Sa présence y est absolument générale et pourrait être utilisée comme caractère de classification. Dans les autres sous-ordres de Décapodes elle manque, si l'on en excepte le genre Crangon avec ses différentes espèces parmi les Macroures.

La série azotée comprend deux termes chez les Décapodes à mélanine :

- 1° Un pigment jaune, réfringent, que j'ai dénommé, nous verrons bientôt pourquoi, *pigment amino-acide*.
- 2° Un pigment brun-noir qui est une *mélanine*.

J'étudierai séparément chacun de ces pigments, puis, dans une partie spéciale, je rechercherai les relations qui les unissent et je montrerai comment la mélanine dérive du pigment amino-acide.

L'objet de mes recherches a été spécialement *Cancer pagurus*, animal particulièrement favorable en raison de la facilité de l'étude chez lui d'une part et en raison de la commodité que l'on a pour se le procurer d'autre part. J'ai vérifié sur un grand nombre d'autres Crustacés décapodes mélaniques les résultats obtenus sur cette espèce.

A. — Pigment Amino-Acide

1. — Historique. — Technique spéciale.

En raison de ses caractères de solubilité ce pigment a été très peu étudié et n'est pour ainsi dire pas connu. HEIM (1892) le confondait grossièrement avec un lipochrome. Ce sont KEEBLE et GAMBLE qui l'ont le mieux décrit et ils ne lui consacrent que quelques lignes, dont une partie est du reste inexacte. « Il existe, disent-ils, un pigment généralement présent chez les Crustacés qui est jaune brillant. Il est gris par lumière transmise et paraît avoir une forme cristalline. On le trouve dans des chromatophores, à côté du brun auquel il ne se mélange pas. — Sa chimie est inconnue. »

Le pigment amino-acide existe en certaines régions à l'état pur chez *Cancer pagurus* et c'est une des raisons qui font de ce crustacé un objet de choix. L'examen à l'état frais a surtout été employé par moi. Il doit être fait extemporanément sur l'hypoderme isolé de l'animal vivant et examiné dans l'eau de mer. J'ai pratiqué des colorations vitales. Si l'on veut obtenir des fixations *in*

situ de ce pigment, il faut tenir compte d'un fait que personne jusqu'à ce jour n'a signalé et qui est sa solubilité dans les réactifs aqueux. C'est pour cette raison qu'il est à peu près ignoré des histologistes. Cette solubilité résulte de la composition chimique du pigment amino-acide. Elle est relativement très faible dans l'eau pure et froide. Elle augmente à chaud et surtout en présence d'acides ou d'alcalis. La dissolution est complète. Il est aisé de la suivre sous le microscope. Les chromatophores se vident complètement de leur contenu.

En revanche, le pigment est tout-à-fait insoluble dans l'alcool absolu et les solvants des corps gras. Si l'on étend l'alcool d'eau, on voit la solubilité augmenter peu à peu.

Je reviendrai sur ces propriétés quand j'aborderai l'étude chimique proprement dite du pigment en question. L'application que nous pourrons en tirer pour l'instant sera, pour sa fixation en vue de la méthode des coupes, l'utilisation d'un fixateur alcoolique. Celui qui m'a donné les meilleurs résultats est un mélange à parties égales d'alcool absolu et de chloroforme. En vingt-quatre heures, la fixation est suffisante ; on passe directement dans le chloroforme et l'on inclut dans la paraffine. La seule précaution, par la suite, est de ne traiter les coupes que par des réactifs alcooliques, car le pigment lui-même n'est pas à proprement fixé, mais reste en place en raison de son insolubilité. Dans les colorants en solution aqueuse le pigment disparaîtrait totalement, si le séjour n'était pas très court. En prenant les soins que je viens d'indiquer, on peut facilement conserver les chromatophores remplis de leur pigment. C'est grâce à cette technique que j'ai pu les localiser, dans

l'hypoderme et suivre, sur les coupes, les transformations que j'étudierai plus loin.

Il est un réactif qui permettrait une fixation vraie du pigment amino-acide : c'est l'acide phospho-tungstique. Il faudrait théoriquement l'utiliser en solution avec de l'acide sulfurique ; mais, dans ces conditions, les tissus ambiants seraient fort endommagés. J'ai pu, en me servant simplement d'une solution assez concentrée (à 30 %) précipiter le pigment sur place. Toutefois, à la suite de ce traitement, les réactions de colorabilité des tissus sont complètement changées ; ils présentent une basophilie marquée même après lavage prolongé. Aussi, je pense que l'on doit réserver l'emploi de l'acide phospho-tungstique pour les réactions histochimiques.

2° Répartition et anatomie microscopique.

La répartition du pigment amino-acide dans l'hypoderme des Crustacés est très large. A la différence des autres pigments, il se rencontre dans les régions non exposées à la lumière. C'est là qu'on le trouve à l'état pur. Chez un certain nombre de Crustacés il s'étend même plus profondément dans le tissu conjonctif enveloppant les organes. Sa disposition est généralement caractéristique ; les chromatophores qui le contiennent sont massés autour des vaisseaux sanguins qu'ils dessinent ainsi en arborisations élégantes et dont ils rendent le parcours commode à suivre. Il suffit, pour observer ce fait, de rabattre, après l'avoir sectionnée avec des ciseaux, la carapace céphalo-thoracique d'un tourteau. L'hypoderme reste adhérent à la portion calcifiée et l'on voit sur sa face interne le trajet des vaisseaux tracé par des lignes jaunâtres, tranchant sur la partie superficielle qui est mélanisée. D'autres chromatophores s'échelonnent

nent dans l'épaisseur de l'hypoderme et, dans la région où la mélanine ne se forme pas, atteignent la surface des téguments.

Là, où le pigment amino-acide est à l'état pur, il peut atteindre en poids, par rapport à l'hypoderme où il se trouve, le pourcentage approximatif de 6 %.

3° Histologie des chromatophores.

En raison de la nature du pigment qu'ils contiennent, j'ai désigné sous le nom d'*amino-acidophores* les cellules qui contiennent le pigment amino-acide. Ce nom correspond à la nomenclature générale des cellules pigmentaires.

L'*amino-acidophore* se présente comme une cellule étoilée dont les prolongements ou chromorhizes sont plus ou moins longs et effilés, suivant l'état de rétraction ou d'expansion. En expansion, la ténuité du produit pigmentaire fait qu'ils peuvent être d'une grande finesse. Il s'agit, à mon avis, de mouvements propres de la cellule et non de déplacement du seul pigment. Le noyau est arrondi, situé dans la partie centrale du cytoplasma et souvent difficile à observer à cause de la substance pigmentaire. La chromatine s'y présente sous forme d'amas ou de granulations. Il est unique dans les cellules jeunes, mais on voit que fréquemment, au cours de son évolution, un *amino-acidophore* est pourvu de plusieurs noyaux. J'ai pu saisir sur le fait des bourgeonnements nucléaires suivis d'amitoses qui donnent naissance à ces différents noyaux. DEGNER (1912) avait fait des observations semblables, sans mentionner à quelles cellules pigmentaires il avait spécialement à faire. Je n'ai jamais aperçu de centre cellulaire, ni de division indirecte. Nous verrons plus loin l'interpréta-

tion que l'on peut donner de cette multiplication des noyaux et le rôle qu'elle peut jouer dans l'évolution des amino-acidophores en mélanophores.

Après dissolution du pigment, on peut voir une structure fibrillaire se présentant sous forme de striations longitudinales dans les chromorhizes en extension. Ces fibrilles rappellent celles des cellules de Leydig. Enfin, dans les éléments jeunes, on met en évidence par les méthodes mitochondriales de petits chondriocentes et des mitochondries. Nous verrons quel rôle jouent ces organites dans l'évolution du pigment.

Les amino-acidophores se rencontrent dans l'hypoderme sous deux aspects ; soit isolés, ce qui est rare chez les Crustacés mélaniques, soit, ce qui est la règle chez eux, formant de véritables réseaux dans lesquels les cellules s'anastomosent par leurs prolongements. Ces réseaux peuvent arriver à former des couches denses où l'individualité des chromatophores devient difficile à saisir, comme dans la région ventrale de l'hypoderme chez *Cancer pagurus*.

4° Morphologie du produit pigmentaire.

Le pigment amino-acide se présente en masse sur l'animal avec une coloration variant du blanc sale au jaune plus ou moins foncé. Sur les préparations à l'état frais, il a, à la lumière réfléchie, un aspect réfringent et une couleur jaunâtre, à la lumière transmise il paraît grisâtre, bistre et c'est de ce nom que je l'avais qualifié dans mes premières notes.

Il faut utiliser un fort grossissement pour reconnaître la texture du pigment amino-acide. Avec un objectif faible il a l'aspect d'un piqueté gris-jaune sur un fond lavé de même couleur. Avec un objectif à immersion à

grand angle d'ouverture on s'aperçoit qu'il est, en réalité, formé de grains extrêmement petits, de taille très homogène de 0,2 à 0,3 micron et régulièrement arrondis. La densité des granules est très forte. A l'état vivant, le cytoplasma des amino-acidophores paraît former un système hétérogène triphasique dont les granules représentent la phase solide et le protoplasma la phase liquide. Ce système a une assez grande fluidité. Sur les préparations à l'état frais les granulations sortent facilement du corps cellulaire par écrasement et on les voit alors dans le milieu ambiant animés d'un mouvement brownien des plus nets. L'alcool en coagulant le protoplasma détruit le système colloïdal, mais les granules insolubles dans ce réactif sont simplement précipités et continuent à être observables. Au contraire si l'on traite le pigment amino-soluble par l'eau ou les réactifs aqueux, il perd rapidement son aspect granuleux et finit par être complètement détruit. Les colorants utilisés habituellement en technique histologique, employés en solutions alcooliques pour ne pas dissoudre le pigment, sont sans action sur lui. Seules les teintures vitales comme le bleu de méthylène ou le bleu-crésyl brillant, qui communiquent une teinte très pâle verdâtre.

Ces couleurs vitales mettent aussi fréquemment en évidence dans les amino-acidophores jeunes d'autres grains, également très petits, qui fixent plus fortement la couleur et paraissent bleu foncé.

En combinant les examens à l'état frais et les coupes soit après fixation à l'alcool, soit après fixation en vue des méthodes mitochondriales, j'ai pu retracer l'histoire des amino-acidophores et notamment l'origine de leurs granules pigmentaires.

Ainsi que je l'ai déjà signalé, dans la profondeur de l'hypoderme, les amino-acidophores apparaissent autour des vaisseaux et des lacunes sanguines à qui ils forment un périthélium. Ce sont, à l'origine, des cellules mésenchymateuses, de simples cellules conjonctives étoilées. A ce stade, on peut d'abord mettre en évidence un riche appareil mitochondrial. Il s'agit surtout de petits chondriocotes disposés en travées, rangés plus ou moins régulièrement dans la portion centrale du cytoplasma et plus spécialement en regard des vaisseaux ; on voit aussi des mitochondries granuleuses formant des chaînettes dénommées chondriomites. C'est sur ce substratum mitochondrial que s'élabore le pigment amino-acide et, d'après les images que j'ai obtenues en coloration vitale, je crois pouvoir affirmer que les granules colorables vitalement par le bleu de méthylène par exemple représentent le premier stade de l'élaboration mitochondriale. Je n'ai pu réussir à colorer vitalement les mitochondries elles-mêmes, comme l'a fait par exemple TURCHINI sur d'autres objets (1919). Les granules colorés, dont il est ici question, ne se voient que dans les cellules où l'élaboration pigmentaire est manifeste et active et où elle n'est pas encore achevée. On les voit facilement dans les chromatophores entourant les vaisseaux et dans les chromatophores qui apparaissent chez les jeunes larves. C'est, je le répète, le premier aspect de la différenciation des granules pigmentaires. Alors que les organites mitochondriaux sont du protoplasma, modifié il est vrai mais encore vivant, les granules colorables vitalement représentent déjà des enclaves. Leur colorabilité vitale s'explique ainsi, si l'on se rappelle que d'après PLATO la coloration vitale représente la réaction d'une enclave morte au

contact du protoplasma vivant. Les granules pigmentaires définitifs, trop évolués chimiquement, ne prennent plus qu'une teinte très pâle.

Je n'envisagerai pas si c'est la mitochondrie qui se transforme ou si l'élaboration a seulement lieu à son niveau. Cette question qui se pose pour toutes les substances élaborées par les mitochondries ne peut être positivement résolue actuellement.

Ainsi les amino-acidophores, en un temps qu'il est impossible d'apprécier, se chargent complètement de pigment dont ils ont puisé les éléments dans le milieu interne. Nous verrons que la meilleure façon d'envisager ce pigment est de le considérer comme formé de produits de protéolyse. Il faut rapprocher de ce fait l'observation de DELAUNAY (1913), qui constata chimiquement chez les Siponcles que l'azote aminé provenant de l'hydrolise des protéiques était fixé par les éléments figurés en suspension dans le liquide cavitaire.

Une fois qu'ils sont bourrés de granules de pigment, on voit les amino-acidophores perdre le contact avec les vaisseaux ou les lacunes sanguines. On se rend compte qu'ils se déplacent dans l'hypoderme en gagnant la surface externe où ils arrivent en contact avec l'épiderme où même insinuent leurs chromorhizes entre les cellules épithéliales. Ce fait se vérifie aisément dans les régions non mélanisées (pl. I, fig. 5). Nous verrons que dans les autres régions l'évolution des amino-acidophores se complique. Au cours de ce déplacement, les amino-acidophores souvent très nombreux arrivent en contact les uns des autres et forment les réseaux dont j'ai parlé.

5° Nature du pigment. Etude chimique.

J'en arrive à l'étude chimique proprement dite du pigment.

En raison de sa solubilité dans l'eau, son extraction des tissus est facile. Cependant, pour que cette opération ait de la valeur, il faut qu'elle réponde aux desiderata suivants :

- 1° Toute autolyse doit être soigneusement évitée ;
- 2° Il faut s'assurer que l'extrait aqueux représente bien le pigment ;
- 3° Il faut s'assurer que cet extrait représente le pigment seul.

1° Pour me mettre à l'abri de toute autolyse, j'opérais de la manière suivante : le lambeau d'hypoderme contenant les chromatophores avec le pigment à étudier était détaché chez l'animal vivant et plongé immédiatement dans de l'alcool absolu. Le tissu était alors broyé avec du sable et repris dans l'eau bouillante. L'extrait était recueilli par filtration dans un ballon aseptique.

Dans ces conditions, il n'est pas possible de dire que les produits observés dans l'extrait aqueux étaient le résultat de l'autolyse des tissus. J'ai fait, du reste, la contre-épreuve ; l'extrait aqueux était fait sans immersion dans l'alcool absolu du tissu, en le broyant simplement avec de l'eau chaude. Dans ces conditions, les résultats quantitatifs étaient les mêmes que ceux obtenus avec la méthode indiquée ci-dessus. Ce n'est qu'au bout de plusieurs heures, en abandonnant l'hypoderme à lui-même que l'on voyait apparaître les véritables produits de l'autolyse telle qu'on la constate dans un tissu quelconque. On a ainsi la preuve qu'aucun agent autolytique à action instantanée n'est présent dans l'hypoderme.

2° L'extrait aqueux obtenu dans les conditions que j'ai

indiquées représente bien la substance pigmentaire. C'est le contrôle du microscope qui apporte là des arguments décisifs. On observe qu'après épuisement par l'eau (chaude ou froide, la durée de l'opération seule varie), les amino-acidophores se montrent absolument vides de pigment, même si l'épuisement a été précédé d'une coagulation des tissus par l'alcool. On peut voir les chromatophores se vider de leur contenu à mesure que la solution aqueuse s'enrichit. D'autre part, on constate que l'extrait aqueux se montre d'autant plus riche en substance extractive que la densité des chromatophores était plus forte dans l'hypoderme envisagé.

3° Il est évident que l'extrait aqueux renferme, à côté du pigment, les sels minéraux contenus dans les tissus, principalement du chlorure de sodium, mais les substances solubles, autres que ces sels, dans l'extrait aqueux, proviennent en presque totalité du pigment.

Les matières protéiques des tissus ambiants ont été coagulées par l'alcool et l'eau bouillante et ne peuvent entrer en ligne de compte. Mais la preuve décisive est fournie par ce fait : si l'on isole autant que faire se peut la région de l'hypoderme riche en amino-acidophores de la région profonde où ils n'existent pas, et qu'on obtienne, comme je l'ai indiqué, un extrait aqueux de ces deux régions ainsi séparées, seul l'extrait provenant de la région riche en amino-acidophores aura les caractères et les réactions que nous allons étudier par la suite. La concordance des résultats obtenus en faisant l'extrait dans l'acide trichloracétique où le pigment est soluble fournit encore une preuve. La quantité d'acides aminés ou autres composés solubles provenant des tissus d'un fragment d'hypoderme, le pigment mis à part est prati-

quement négligeable. DELAUNAY (1913) en indique d'une manière générale quelques miligrammes pour cent grammes de tissu.

Ainsi l'étude de l'extrait aqueux del'hypoderme, obtenu dans les conditions que j'ai indiquées, va me permettre de déterminer la nature chimique du pigment. Et comme vérification je montrerai ensuite que l'on peut reporter sur le pigment contenu dans les chromatophores au sein même des tissus, toutes celles des réactions qui sont compatibles avec une localisation histologique convenable, comme l'exige une méthode histochimique tant soit peu précise.

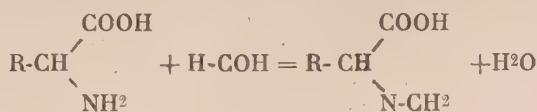
Caractères généraux. — La dissolution du pigment amino-acide dans l'eau est complète. La solution qui en résulte est d'une couleur jaune très pâle et a une saveur fade. D'autre part, le pigment est, ainsi que je l'ai déjà dit, totalement insoluble dans l'alcool et les solvants des corps gras. Ces faits écartent la possibilité de la présence dans sa constitution d'un composé se rattachant aux graisses ou aux lipoides, ce qui sera confirmé par l'histochimie.

Parmi les corps solubles dans l'eau, j'écarte tout de suite les composés se rattachant au noyau purique. Leur recherche dans l'extrait aqueux a toujours été négative soit par l'addition de nitrate d'argent en milieu ammoniacal, selon la méthode de SALKOWSKI, soit par la méthode de KRÜGER et SALOMON (sulfate de cuivre après bisulfite de sodium), soit par les réactions classiques de la murexide ou de WEINEL.

Je n'ai jamais trouvé non plus d'urée. La recherche de l'azote par formation de cyanure se montre toujours

positive et des plus nettes. On se trouve donc bien en présence de composés azotés. Guidés par des considérations théoriques, j'eus l'idée de rechercher si cet azote n'était pas, en partie du moins, à l'état d'azote aminé.

L'addition de formol neutralisé et étendu à l'extrait aqueux, également neutralisé, fait apparaître dans le milieu une réaction fortement acide. Cette réaction n'est donnée dans ces conditions que par la guanine (FREY et GIGON, 1909), par les sels ammoniacaux et par les corps contenant dans leur molécule un groupement amino-acide. Or j'ai montré qu'il n'y avait dans le pigment aucun corps de la série purique. Il n'y a pas d'ammoniaque libre au réactif de NESSLER. L'acide phosphomolybdique ne détermine pas de précipité. Les sels ammoniacaux ne peuvent donc être non plus mis en cause. Il s'agit bien de corps contenant des groupements amino-acides et la réaction en présence de formol se passe selon la formule de la réaction de SCHIFF (1901) :



R représente un radical variable. On dit que le groupement aminé est bloqué par l'action de la formaldéhyde et la fonction acide n'étant plus neutralisée par lui, le dérivé méthylénique obtenu, se comporte comme un acide énergique et peut être dosé par les méthodes acidimétriques. Cette réaction est des plus nettes et elle est couramment employée pour la recherche quantitative de l'azote aminé (SØRENSEN 1910). Je l'ai mise à profit et exposerai plus loin les résultats qu'elle m'a donné.

Une série de réactions viennent confirmer la présence

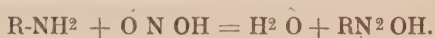
de groupes amino-acides démontrée par la réaction de SCHIFF.

L'extrait aqueux dissout à chaud l'oxyde de cuivre hydraté en prenant une teinte bleue pâle.

L'acide azoteux (nitrite de Na en solution acidé) réagit, avec dégagement d'azote, selon la formule bien connue :



Cette réaction est caractéristique d'un groupe aminé dans un composé linéaire. Mais en même temps on obtient une autre réaction (DAMIANOVICH et GUGLIAMELLI) qui est une véritable diazotation due à la présence d'un groupement aminé nucléaire dans un composé aromatique, suivant la formule :



Il reste à déterminer à quelle catégorie de corps contenant des groupements amino-acides le pigment peut se rattacher. On sait en effet, surtout depuis les travaux de FISCHER, de MAILLARD et d'autres, que les matières protéiques sont composées de chaînes de polypeptides qui, à leur tour, sont formées par l'union d'acides aminés. Ces différents corps donnent la réaction de SCHIFF. Auxquels peut-on rattacher le pigment ? Les protéiques proprement dits sont à écarter, étant coagulés dans les conditions où l'extrait aqueux est fait et séparés par filtration. D'autre part, cet extrait ne donne pas la réaction du biuret. Il ne contient pas de corps biurétiques et ne peut donc comprendre que des acides aminés ou des polypeptides à chaîne courte. En raison du rapport de l'azote aminé à l'azote total que nous verrons être de 1 à 3, c'est très vraisemblablement à un mélange de ces derniers que l'on a à faire. Cette manière de voir est confirmée :

1°. Par le fait que la solution aqueuse de pigment

est précipitée par l'acide phospho-tungstique mais pas par l'acide trichloracétique.

2° Par l'examen de l'extrait sec obtenu en évaporant sur une lame la solution aqueuse du pigment. On se trouve en présence d'un composé amorphe, tandis que, après hydrolyse (par l'acide chlorhydrique ou un ferment digestif tel que la trypsine), on voit apparaître différents corps cristallisés qui représentent des acides aminés. Au bout de quelques jours cette hydrolyse commence dans la solution aqueuse abandonnée à elle-même, probablement sous l'influence de fermentations bactériennes.

Ainsi le pigment jaune réfringent des crustacés se montre comme un complexe, soluble dans l'eau, formé de l'enchaînement de corps à fonction amino-acides. C'est pourquoi je lui ai donné le nom de *pigment amino-acide* qui rappelle les fonctions chimiques principales des corps qui le forment.

Dosage de l'azote aminé

J'ai déterminé quantitativement, en me rapportant à 100 grammes de tissu frais, la proportion d'azote aminé existant dans le pigment amino-acide, provenant de différents crustacés. La méthode de dosage de l'azote aminé par le formol a été utilisée dans de nombreux travaux de chimie biologique par SØRENSEN, RONCHÈSE, GORTNER et surtout DELAUNAY, dans ses recherches sur l'azote des Invertébrés, et par MAILLARD dans son remarquable travail sur la genèse des matières protéiques. Cette méthode est parfaitement au point et donne des résultats très satisfaisants, à condition, comme le remarque MAILLARD, de

« régler soi-même les détails de la technique à l'aide de contrôles méthodiques sur des liquides de composition donnée ».

Des fragments d'hypoderme prélevés sur l'animal vivant étaient pesés rapidement et je pratiquais les dosages d'une part sur des extraits aqueux obtenus comme je l'ai indiqué, et pour contrôle sur des solutions obtenues suivant la technique indiquée par Delaunay. L'hypoderme broyé est repris par une solution d'acide trichloracétique.

Dans les deux cas, la solution est soigneusement neutralisée. L'extrait aqueux du pigment présente une très légère acidité égale en moyenne à 1 cm³ de soude à N/50 par gramme de tissu. On additionne alors de formol neutre en excès et l'on mesure le volume de liqueur de soude ou de baryte N/50 nécessaire pour ramener la neutralité. Si l'on utilise la liqueur de baryte, il faut au préalable traiter la solution par du chlorure de baryum à 10 % de manière à précipiter les sels formant avec le baryum des composés insolubles.

Pour apprécier le retour de la neutralité, on se sert de phénolphthaléine ; mais ainsi que l'a bien montré MAILLARD (1914), il faut, pour avoir des résultats précis, arriver non à l'apparition de la teinte rose pâle, mais à celle d'une teinte rose franc que l'on détermine du reste facilement en pratiquant des dosages sur des solutions titrées d'acides aminés. Par les deux méthodes (eau bouillante et acide trichloracétique), les résultats sont absolument comparables. Je donne ci-joint les chiffres obtenus chez *Cancer pagurus* dans les régions où le pigment amino-acide est à l'état pur. Ces chiffres repré-

sentent en grammes la quantité d'azote aminé formolizable pour 100 grammes de tissu frais.

N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
0, 224	0, 212	0, 220	0, 215
N° 5	N° 6	N° 7	N° 8
0, 228	0, 250	0, 195	0, 225

J'exposerai en parlant de la formation de la mélanine les chiffres obtenus dans les autres régions de l'hypoderme.

Ce tableau permet de constater que, dans les régions où le pigment amino-acide est à l'état pur, le taux de l'azote aminé est très sensiblement constant. Ce taux est élevé si on le compare aux chiffres d'azote aminé contenu dans les autres tissus (l'hépto-pancréas mis à part) et indiqués par DELAUNAY (1913), qui trouve par exemple 5 milligrammes pour 100 grammes de sang. Il n'y a pas à tenir compte des chiffres du premier travail de DELAUNAY (1910) qui sont faussés, ainsi que l'a reconnu l'auteur, par le fait qu'il opérait en présence de matières protéiques.

L'élévation de ce taux d'azote aminé est due à l'abondance du pigment amino-acide. On peut du reste contrôler que chez les animaux où le taux est le plus élevé (comme le *Cancer*), le microscope montre une accumulation d'amino-acidophores.

En traitant préalablement l'extrait de pigment amino-acide par l'acide phospho-tungstique en solution sulfurique, on obtient, ainsi que je l'ai indiqué, un précipité. En neutralisant la solution et en dosant par le formol

l'azote aminé on constate qu'il n'en reste plus que des traces. Le composé contenant l'azote aminé a été précipité.

J'ai également dosé l'azote aminé après hydrolyse par l'acide chlorhydrique à 50° pendant quelques jours. Dans ces conditions les acides aminés formant le pigment sont séparés et le taux de l'azote formolisable s'élève. Dans le cas du Cancer n° 8, par exemple, j'ai obtenu 0 gr. 530. Ce résultat est d'un grand intérêt comme je le montrerai.

Enfin, j'ai pratiqué comparativement le dosage de l'azote total contenu dans l'extrait de pigment amino-acide par la méthode de KJELDAHL et de RONCHÈSE. Chez les mêmes animaux et le même hypoderme que le tableau ci-dessus, on trouve pour 100 grammes de tissu frais.

Cancer n° 2 = 0 gr. 613 ; *Cancer n° 4* = 0 gr. 598.

Comme le taux d'azote aminé, le taux d'azote total est constant. L'azote aminé représente environ 30 % de l'azote total. La différence que j'appellerai azote restant, est due soit à la présence de polypeptides, soit à celle d'acides diaminés. En effet dans un polypeptide formé par exemple de 3 chaînons :



après blocage du groupement aminé libre par le formol, une seule fonction acide est libérée et pour trois atomes d'azote un seul est indiqué par le dosage. Dans le cas des acides diaminés un seul groupement COOH est libéré pour le blocage de 2 NH².

Le taux de l'azote aminé après hydrolyse est presque semblable à celui de l'azote total et, cela se conçoit après ce que je viens de dire, les acides aminés étant reconstitués. Ce fait est en faveur d'un polypeptide. La légère différence peut tenir à ce que l'hydrolyse n'est pas tout

à fait complète ou qu'il y a parmi les constituants des acides diaminés.

Composition qualitative

Maintenant que voilà connu quantitativement le pigment amino-acide, il est intéressant de rechercher sa composition qualitative, de se demander quels sont les acides aminés qui contribuent à le former par leur union.

Pour résoudre convenablement cette question, il aurait fallu pratiquer la méthode de FISCHER. Mais je ne suis pas outillé pour me lancer dans de telles recherches, qui sortiraient du cadre de mon travail, et je ne disposais pas de quantités suffisantes de pigment. Aussi me suis-je contenté par des réactions qualitatives de rechercher la présence ou l'absence des acides aminés courants.

J'ai dit plus haut qu'après hydrolyse par l'acide chlorhydrique on amenait certains corps à cristalliser, après évaporation sur une lame. On reconnaît alors facilement surtout les cristaux de la leucine et de la tyrosine.

Les réactions caractéristiques de la tyrosine sont toujours accentués : celles de MILLON, de PIRIA. Je montrerai que le noircissement du pigment amino-acide des Crustacés à mélanine par une solution de tyrosinase est également dû à la tyrosine. Il faut également imputer à cet acide aminé aromatique la coloration rouge-orangé que l'on obtient par la diazo-réaction d'EHRlich et qui a lieu en présence d'un phénol. La réaction xantho-protéique est positive. Caractéristique d'un noyau aromatique, elle se rapporte vraisemblablement toujours au même corps.

La présence d'une petite quantité de soufre semble indiquer que la cystine se trouverait aussi enchaînée dans le pigment amino-acide. La recherche du tryptophane par l'eau de brome s'est toujours montrée négative. L'identification des autres acides aminés sur d'aussi petites quantités de substance est trop délicate pour pouvoir se prononcer avec certitude. Je n'ai jamais pu mettre en évidence de phosphore ni de fer.

6° Application histochimique.

Il convient, maintenant que nous connaissons la nature chimique et les réactions principales du pigment amino-acide, de transporter sous le microscope ces réactions et de nous efforcer de les réaliser *in situ* sur les tissus examinés à l'état frais et si possible sur les coupes. Cette réalisation histochimique aura un double résultat. D'abord elle constituera un moyen précieux d'investigation, lorsque nous nous adresserons à des animaux non encore étudiés, en nous permettant d'identifier le pigment amino-acide par des réactions faites au sein des tissus sans avoir à nouveau besoin de recourir aux méthodes chimiques plus longues. L'histochimie nous permettra ensuite de raisonner les techniques utilisables pour l'étude histologique proprement dite du pigment.

Pratique de l'examen histochimique.

On détache sur l'animal sacrifié un fragment d'hypoderme contenant les chromatophores à étudier et on l'étale sur une lame de verre. Après avoir vérifié les caractères physiques : couleur, réfringence, extinction en lumière polarisée, on recherche les caractères de solubilité.

La saturation rapide des solvants, qui aurait lieu si l'on se contentait d'en verser quelques gouttes sur la lame à plat, peut donner de fausses indications. Pour l'éviter, le mieux est de placer le solvant dans un tube Borrel où la lame avec l'hypoderme étalé est tenue verticalement. On vérifie d'abord l'insolubilité dans l'alcool absolu, puis la solubilité plus ou moins rapide dans l'eau froide (très lente), dans l'eau chaude, dans l'eau acidulée par un acide minéral ou organique (exception faite pour l'aide phospho-tungstique), dans l'eau alcalinisée par la soude, la potasse ou l'ammoniaque.

On assiste, en contrôlant de temps en temps sous le microscope, à la disparition graduelle, mais complète, du pigment contenu dans les chromatophores, lorsqu'il s'agit de pigment amino-acide.

J'ai signalé que la première conséquence de ces caractères de solubilité était d'imposer l'emploi d'un fixateur à base d'alcool absolu pour conserver le pigment amino-acide sur les pièces destinées à être coupées.

Réaction du formol. Je me suis efforcé de transporter en histochimie la réaction du formol. Je n'ai malheureusement pu y arriver, car, en faisant agir directement le formol au contact des tissus, les groupes amino-acides des protéiques, même après coagulation par l'alcool, sont bloqués par le formol, et fausseraient la réaction. J'ai du moins cherché à mettre au point une méthode qui permette, sans recourir à une véritable opération chimique, de se rendre compte si le tissu que l'on étudie contient des corps solubles, possédant des fonctions amino-acides. Voici un procédé qui peut être réalisé facilement avec le contrôle du microscope, mais qui

n'est pas une réaction histochimique. Il m'a donné des résultats satisfaisants, mais il demande beaucoup de minutie. On peut l'appliquer sur des lambeaux d'hypoderme étalés *in toto* et fixés par l'alcool absolu ou sur des coupes. Il sera plus délicat dans ce dernier cas, la quantité de pigment étant minime.

Il faut avoir à sa disposition une solution de formol dédoublée et neutralisée exactement. Le mieux pour y arriver est de conserver le formol avec quelques morceaux de craie. Au moment de l'emploi on ajoute de la phénolphthaléine comme indicateur et l'on verse goutte à goutte de la solution N/100 de soude jusqu'à virage, au rose très pâle.

Après l'avoir étalé sur une lame, on arrose l'hypoderme largement avec de l'eau distillée neutre et on le met en chambre humide, à une douce température. Dans ces conditions le pigment amino-acide se dissout dans l'eau. Quand la dissolution est faite, ce qui peut être long, étant donné que la petite quantité d'eau se sature vite, ou du moins qu'elle est très avancée, on recueille cette eau dans un verre de montre et l'on y ajoute des traces de soude N/100 en présence de phénophtaléine de façon à obtenir une teinte rose pâle. On verse alors quelques gouttes de formol préparé. La teinte rose disparaît immédiatement et il faut rajouter un nombre assez considérable de gouttes de la solution de soude pour la ramener.

On peut également utiliser comme indicateur le rouge neutre qui vire instantanément au jaune en présence d'une trace d'alcalinité et dont la couleur rouge reparait en milieu acide.

Réactions spéciales.— La difficulté de leur application à l'histochimie provient du fait que les granules de pigment se trouvent solubilisés par les réactifs présents avant que la réaction se produise et que les tissus sont plus ou moins endommagés par ces mêmes réactifs. De sorte que la réaction n'a pas une localisation précise.

En opérant avec précaution j'ai pu obtenir une réaction de Millon, bien nette dans certain cas, mais les tissus la donnent d'une manière générale en raison de la présence de tyrosine dans les matières protéiques qui les constituent.

J'ai réussi la réaction xantho-protéique en exposant pendant quelques secondes, à des vapeurs d'acide azotique nitreux bouillant, une lame portant des coupes ou un lambeau étalé de l'hypoderme. Les amino-acidophores prennent une teinte jaune qui s'accroît en exposant consécutivement à des vapeurs ammoniacales.

J'ai signalé que l'acide phospho-tungstique en solution sulfurique précipitait le pigment amino-acide. On peut déterminer ce précipité au milieu des tissus, mais le traitement n'est pas sans danger pour les tissus. Avec une solution assez concentrée sans acide sulfurique, la réaction a encore lieu et peut être appliquée avec moins de risques en histochimie.

La diazotation suivant la formule de DAMIANOVICH est positive mais confond les tissus en une masse amorphe. Elle est du reste donnée par les protéiques en raison de leurs groupements aminés aromatiques nucléaires.

Les réactifs histologiques spéciaux : tétroxyde d'osmium, Soudan de Daddi, ne permettent pas de mettre en évidence de corps gras ou de lipoides dans les amino-acidophores. Les méthodes chimiques n'en avaient pas

montré davantage dans le pigment extrait de ces cellules.

7° Variations chez les autres Décapodes mélaniques.

Les résultats que je viens d'exposer ont été obtenus chez *Cancer pagurus*. Je les ai vérifiés chez les autres Crustacés Décapodes à mélanine que j'ai étudiés, soit par les méthodes chimiques quand les animaux étaient assez gros, soit par les méthodes histochimiques. Les Crustacés Décapodes à mélanine se présentent sous deux aspects :

Un premier aspect dont *Cancer pagurus* est le type, où par suite de dispositions anatomiques, certaines régions de l'hypoderme contenant des chromatophores ne subissent pas l'action de la lumière. Dans ces régions le pigment amino-acide est à l'état pur. C'est chez ces Crustacés, comme je le montrerai en étudiant la formation de la mélanine, qu'on peut suivre avec précision la diminution du pigment amino-acide au fur et à mesure de l'apparition de la mélanine. Tous les brachyours se ramènent à cette description, mais suivant la disposition plus ou moins aplatie de leur carapace et suivant leur genre de vie plus ou moins active la région où le pigment amino-acide est à l'état pur se réduit plus ou moins. Les dosages indiqués ont été faits sur l'hypoderme provenant de cette région. (N aminé pour cent de tissu).

Carcinus n° 1 - Ogr., 247. *Carcinus* n° 2- Ogr., 249.
Carcinus n° 3- Ogr., 280.

Le deuxième aspect est représenté par le seul genre *Crangon*. Le pigment amino-acide est chez lui réduit à quelques chromatophores isolés. En raison de la disposition de la carapace, la majeure partie des chromatophores est chargée de mélanine.

La forme des cellules ainsi que l'aspect du pigment sont absolument généraux chez les Décapodes à mélanine. La couleur seule varie légèrement, suivant les espèces examinées. La teinte générale est toujours blanc jaunâtre, mais elle peut tirer sur le verdâtre ou le bleuâtre très pâles sans que les différents caractères soient en rien modifiés. Je n'ai pu déterminer à quel composé ces couleurs étaient dues.

B. — Mélanine

La mélanine représente le second terme des pigments de la série azotée. C'est un pigment répandu abondamment à travers toute la série animale. Il est le mieux connu histologiquement parce qu'il résiste à toutes les manipulations des techniques courantes. Aussi un nombre immense de travaux le concernent.

1° — Méthodes d'étude

Si l'on veut s'en tenir à l'étude de la mélanine en elle-même, toutes les méthodes de l'histologie peuvent être utilisées. Mais si l'on veut saisir la place de cette mélanine dans le métabolisme pigmentaire, si l'on veut déterminer son origine, il faudra utiliser des méthodes qui conservent en même temps les autres pigments et plus spécialement les méthodes qui permettent l'étude du pigment amino-acide. C'est grâce à l'emploi des techniques que j'ai exposées au sujet de ce pigment que j'ai pu démontrer le processus de la mélanisation. Je vais consacrer quelques pages à la description de la mélanine envisagée au terme de son évolution quant à sa répartition, son histologie et sa chimie.

2° — Répartition, Situation

Les mélanophores se rencontrent dans l'hypoderme, et seulement dans les régions éclairées. Aussi chez les Crustacés, où la lumière ne peut faire sentir ses effets sur la face ventrale, les mélanophores sont localisés à la face dorsale du corps ou des différents appendices. Leur situation dans l'hypoderme est toujours très superficielle. Ils sont appliqués contre les cellules épidermiques et leurs chromorhizes s'insinuent entre ces cellules les séparant parfois profondément.

Dans les régions très mélanisées, comme l'hypoderme dorsal de *Cancer pagurus*, on peut voir les mélanophores anastomosés en réseau tout comme les amino-acidophores.

3° — Histologie

La structure histologique des mélanophores est la mieux connue des cellules pigmentaires. C'est elle qui a servi de type aux descriptions de la plupart des auteurs. Aussi je renvoie pour ces détails au chapitre II de ce travail. Je me contenterai de décrire ici les faits que j'ai observés. (Pl. I. fig. 1).

L'aspect général, en mettant à part la morphologie du produit pigmentaire, est très semblable à celui d'un amino-acidophore. Un mélanophore se présente comme un élément étoilé pourvu de chromorhizes. Comme toutes les cellules pigmentaires, un tel élément est sous la dépendance du système nerveux et présente des phénomènes d'expansion et de contraction. L'étude de ces phénomènes ainsi que celle des nerfs des chromatophores reste en dehors de mon sujet actuel. Mlle KÖNIGS a

étudié chez les Batraciens et les Céphalopodes l'excitabilité de ces nerfs pigmento-moteurs (1915).

J'ai pu observer dans certains cas la striation longitudinale des chromorhizes. Ces chromorhizes, pour les mêmes raisons que ceux des amino-acidophores, peuvent être extrêmement fins et divisés abondamment donnant l'image d'une branche délicatement ramifiée. Les mélanophores peuvent atteindre de grandes dimensions, 200 à 250 μ . Il sont toujours plurinucléés, le nombre des noyaux pouvant varier de 2 à 4 ou 5. Il s'agit alors de véritables cellules géantes. Les noyaux sont arrondis, généralement situés dans le centre du chromatophore ou à la base des chromorhizes quand la cellule est en expansion. La chromatine est toujours contenue dans ces noyaux à l'état diffus, ce qui leur donne après coloration un aspect homogène, lorsque les mélanophores sont complètement mélanisés. En raison de l'abondance de la substance pigmentaire, les détails cytologiques sont souvent difficiles à observer et il faut procéder à la dépigmentation. Cette dépigmentation ne laisse subsister aucun substratum à la place des grains de mélanine.

On ne peut observer de mitochondries dans les mélanophores évolués.

4° Morphologie du produit pigmentaire.

La mélanine se présente toujours sous forme de grains régulièrement arrondis mais de taille variable, pouvant aller de 0 μ 4 à 0 μ 75, c'est-à-dire varier presque du simple au double en diamètre apparent et de 1 à 8 en volume. Sur une coupe les grains intéressés par la section

paraissent plus clairs au centre et comme formés de strates concentriques. Les grains remplissent régulièrement le cytoplasma dans un chromatophore adulte, laissant en plus clair les emplacements des noyaux. Je réserve pour la suite la description de l'apparition de ces grains dans les mélanophores en formation.

La couleur de la mélanine est généralement d'un brun noir. Elle offre quelques variations suivant les espèces considérées comme je l'indiquerai dans le paragraphe suivant. Ses grains sont opaques, aussi paraissent-ils plus noirs examinés à la lumière transmise. Ils ne présentent jamais le mouvement brownien, qui est la règle pour les granules du pigment amino-acide.

5° Chimie du pigment.

La mélanine, spécialement chez les vertébrés et les mammifères, a déjà fait l'objet d'un grand nombre de recherches chimiques dans le but de déterminer sa composition. Les vertébrés, en raison de l'abondance parfois considérable de pigment mélanique, constituent des objets de choix pour ce genre de recherches. Chez les crustacés au contraire la quantité se limite chez les animaux les plus riches à quelques milligrammes, ce qui rend difficile son extraction.

J'exposerai rapidement les idées actuelles sur la composition de la mélanine, puis j'indiquerai les résultats que j'ai pu obtenir sur les Crustacés.

Extraction. — Les procédés d'extraction de la mélanine du sein des tissus peuvent se ramener à deux types : les procédés chimiques qui présentent de nombreuses variantes ; les procédés mécaniques qui se ramènent à peu près uniquement à la méthode de PIETTE (1911).

Procédés chimiques. Ils consistent essentiellement à dissoudre la mélanine dans une lessive alcaline concentrée. Le pigment est par la suite précipité de sa solution par neutralisation et légère acidification. Dans ces conditions les matières protéiques sont détruites et la mélanine résiste. Il suffit de la laver avec soin, au besoin on la redissout dans une lessive et on la précipite à nouveau. ABEL et DAVIS macèrent à froid les tissus dans une lessive de potasse à 30 %. Quand le liquide est bien noir, on additionne d'alcool. On recueille le précipité qui contient la mélanine. On le lave à l'acide chlorhydrique à 50 %. La mélanine est dissoute dans la potasse et reprécipitée par l'acide acétique. On lave à l'alcool, à l'éther le précipité séparé, essoré et lavé à l'eau. SPIEGLER a inauguré (1903) la préparation des acides mélaniques qui seraient à la base de la mélanine. Il s'agit d'une méthode extrêmement brutale, puisque le tissu contenant le pigment est tour à tour traité par une lessive de soude, par l'acide chlorhydrique. Le précipité noir ainsi obtenu est redissous dans l'acide sulfurique concentré pour être purifié.

Procédés mécaniques. PIETTRE s'est élevé contre les procédés chimiques d'extraction de la mélanine. Sa principale critique est que l'action hydrolisante des acides ou des bases destinées à détruire les matières protéiques a bien des chances de s'exercer aussi sur le pigment lui-même. Il utilise la méthode suivante : après avoir passé au broyeur le tissu dont on veut extraire la mélanine on obtient une pulpe brunâtre. Cette pulpe est mêlée à un grand volume d'eau distillée froide et versée dans des vases à précipiter placés à la glacière. Après 24 heures de contact, il s'est formé un culot grisâtre, la liqueur surnageante offre une coloration brunâtre due à la présence de grains de mélanine de différentes dimensions à l'état de pureté. On siphonne avec soin pour éviter tout entraînement du dépôt. On centrifuge le liquide ainsi séparé. Une fois séchée, la substance pigmentaire est une poudre brune à reflets roux. GORTNER (1912) a employé une méthode analogue et en revendique la priorité sur PIETTRE.

Récemment, DE COULON (1920) a utilisé la digestion pepsique

après broyage pour extraire le pigment d'un mélanome de cheval.

J'ai utilisé à mon tour les méthodes chimiques et la méthode de PIETTRE. Avec les unes et les autres, j'ai pu extraire de la mélanine des Crustacés. Le but que je cherchais n'était pas de faire une analyse élémentaire complète, mais simplement de doser l'azote total fixé sous forme insoluble dans la mélanine contenu dans un poids connu d'hypoderme. A ce point de vue la méthode de PIETTRE ne m'a pas convenu car elle ne permet pas une extraction quantitative complète du pigment dans un tissu. Sous peine d'entraîner le dépôt on ne peut siphonner complètement le liquide où sont suspendus les grains de mélanine.

J'ai eu recours à la méthode d'ABELET DAVIS grâce à laquelle j'ai pu extraire toute la mélanine d'un poids donné d'hypoderme.

Composition et propriétés de la mélanine.

En raison de la variété des méthodes employées d'une part, en raison de la diversité certaine des mélaninés, les résultats des recherches tendant à fixer à ces pigments une composition chimique ne concordent guère. L'on ne peut jusqu'à présent tirer que des conclusions très générales.

Le terme mélanine comprend une série de pigments apparaissant dans l'organisme des vertébrés et des invertébrés dans des conditions normales et pathologiques. Ils se caractérisent par leur couleur noire ou brune, leur existence sous forme de grains. Ils sont insolubles dans l'eau, les acides étendus, l'alcool, l'éther et autres solvants indifférents. Ils sont au contraire solubles dans les solutions alcalines et certains acides concentrés.

SIEBER (d'après OBERNDORFER, 1908) établit plusieurs catégories de mélanines suivant qu'elles possèdent du fer ou non dans leur molécule, suivant qu'elles sont pauvres ou riches en soufre.

ISHISAKA (1908) insiste sur l'importance du soufre.

Je renvoie à l'article documenté d'OBERNDORFER, ainsi qu'aux travaux de LANDOLT (1899), de PRIMAVERA (1908), de PALADINO (1909), de FASAL (1913), pour plus de détails sur

la bibliographie de cette question. Les analyses élémentaires indiquent pour la composition élémentaire de la mélanine, comme chiffres moyens, pour cent :

C entre 52 et 60, H entre 3 et 5, N entre 10 et 12. O représente le nombre résiduel, moins parfois S variant de 0,40 à 3,43. Le fer est encore plus inconstant.

Pour SCHMIDT (1917), elle serait caractérisée par le rapport en poids, N = 14, H = 5, C = 60.

PIETTRE croit, à la suite des résultats obtenus avec sa méthode, que la mélanine est constituée par un groupe albuminoïde que l'hydrolyse permet d'isoler et par un noyau pigmentaire plus condensé, d'un noir jais, insoluble dans les acides, très soluble dans les alcalis. Ce noyau est seul extrait par les méthodes chimiques. GORTNER pense aussi que la mélanine est en réalité une mélano-protéine.

La question, on le voit, est loin d'être tranchée. Il est probable qu'il y a un grand nombre de mélanines suivant le corps aux dépens duquel elles prennent naissance et qu'une partie de ce corps non transformée constitue un noyau secondaire à côté du noyau pigmentaire. Je reviendrai sur ce point en étudiant la mélanogénèse.

En traitant par la méthode d'ABEL et DAVIS l'hypoderme de *Cancer pagurus*, j'ai obtenu les résultats suivants :

Poids de tissu traité = 4 gr. 710. Après avoir dosé l'azote aminé soluble, j'ai extrait la mélanine dont j'ai obtenu 0 gr. 061.

L'azote total, recherché par la méthode de Kjeldahl, représentait 0 gr. 0085. Ces chiffres donnent 0 gr. 180 d'azote total mélanique pour 100 grammes d'hypoderme et 13,8 d'azote en poids pour 100 de pigment mélanique.

Par la méthode de PIETTRE, j'ai obtenu en traitant l'hypoderme de plusieurs tourteaux, 0 gr. 140 de méla-

nine dont l'azote total était 0 gr. 01876 soit 13,3 d'azote en poids pour 100 grammes de mélanine.

En traitant environ 150 individus de *Crangon vulgaris* par la méthode d'ABEL et DAVIS j'ai obtenu 0 gr. 075 de mélanine dont l'azote total était 0 gr. 0086, soit 11,4 d'azote en poids pour 100 de pigment.

Je n'ai pas trouvé de fer dans ces diverses mélanines, sinon à l'état de traces infinitésimales. En revanche elles étaient assez riches en soufre.

La mélanine des Crustacés décapodes présente les caractères généraux des mélanines. Elle est facilement soluble dans les alcalis et dans l'acide sulfurique concentré, insoluble dans tous les autres solvants. Les oxydants énergiques comme le chlore la décolorent rapidement en la détruisant.

Sa coloration varie chez les espèces. Elle est généralement d'un brun noirâtre (*Cancer*, *Carcinus*), mais elle peut être d'un noir bleuté (*Pisa*) ou tirer sur le violet (*Crangon*). La mélanine de *Crangon* paraît un peu différente de celle des Brachyours, en raison de sa couleur, de sa richesse moins grande en azote et de sa solubilité plus facile dans les acides.

6° Histochimie de la mélanine.

Ce pigment étant chimiquement le plus résistant, son identification histochimique est des plus simples. On peut dire que tout pigment résistant aux traitements des techniques courantes de l'histologie et coloré en brun-noir est une mélanine. On peut compléter l'épreuve en constatant sur les coupes l'insolubilité du pigment dans les acides étendus et sa solubilité dans les solutions alcalines.

La coloration en noir par le nitrate d'argent n'a rien de spécifique. Elle peut rendre des services pour l'étude morphologique du pigment. La dépigmentation sur les coupes est des plus faciles. J'ai surtout employé la méthode indiquée par MAYER et GRYNFELTT. On étend un lit de chlorate de potasse au fond d'un tube rempli d'alcool et l'on porte, à l'aide d'une pipette, de l'acide chlorhydrique au contact du chlorate. La lame à traiter est placée verticalement. Il se dégage du chlore et la dépigmentation est obtenue en quatorze heures environ dans le cas présent.

7° Variations de la mélanine chez les Décapodes.

Les principales variations portent sur sa quantité, sa couleur et son aspect. La quantité est fort variable. *Cancer pagurus* paraît le plus riche. Les mélanophores en contact par leurs chromorhizes forment chez lui un véritable réseau. Chez *Portunus*, chez *Carcinus* la mélanine est moins abondante. Le nombre des mélanophores est encore plus réduit chez les autres brachyours. Chez *Crangon* il est relativement assez élevé.

J'ai indiqué plus haut les variations de la couleur. La taille des grains varie aussi dans de faibles limites. Ils sont plus gros chez *Pisa* et chez *Crangon* que chez les autres décapodes à mélanine.

C. — Formation de la Mélanine

Pour pouvoir saisir le mécanisme de la formation de la mélanine chez les Crustacés qui nous occupent, il convient de considérer comment ce mécanisme a été interprété et expliqué à un point de vue général.

1° Exposé des théories.

Des recherches ont été faites sur des produits isolés *in vitro*, d'autres se sont efforcées de saisir les processus sur l'animal même. Parmi les premiers essais qui ont été réalisés, se placent une série de travaux d'ordre purement chimique. Un certain nombre d'auteurs ont obtenu, en oxydant des protéiques, des substances noires qu'ils ont cru pouvoir homologuer à la mélanine. C'est ainsi que SCHMIEDEBERG (1897) obtient, en chauffant de l'albumine avec des acides minéraux concentrés, une solution qui, après s'être colorée en violet ou en rougeâtre, devient brun noir et laisse précipiter un pigment de cette couleur. VON FÜRTH (1904), par action de l'acide azotique sur l'albumine, HAUSSMANN, en chauffant de la globine avec de l'acide chlorhydrique, ont obtenu des substances analogues à la mélanine.

Rien ne prouve que ces substances se rapprochent chimiquement de la mélanine. MAILLARD, en particulier, estime qu'il faut les en séparer complètement sous le nom de mélanoidines. Pour lui, les mélanoidines tout comme les matières humiques, appartiennent au même groupe que les corps obtenus dans ses recherches, par l'action des acides aminés sur les sucres. On sait par exemple que MAILLARD a obtenu, en faisant réagir un mélange de glycocolle et de glucose, un produit amorphe noir, en grande partie insoluble dans l'eau. Cette réaction rapide à 100° devient très violente à 130° et à 150° avec un dégagement abondant d'anhydride carbonique. Les aminos-acides libérés par l'hydrolyse des matières protéiques doivent réagir de même sur les molécules sucrées presque toujours présentes dans ces matières ou tout au moins sur des molécules aldéhydiques ou cétoniques capables d'agir à la façon des sucres. Et MAILLARD conclut : « Il y aura lieu, dans l'avenir, de distinguer soigneusement la part qui, dans la genèse des corps colorés, revient aux molécules cycliques (tyrosine) et aux simples amino-acides linéaires. » Ainsi, les oxydations pratiquées par des méthodes

chimiques sur des molécules protéiques n'ont pas de rapport avec la production de la mélanine naturelle.

Je ne cite que pour mémoire les observations de POUCHET (1891), qui obtenait, en traitant du sang par de l'alcool et du bichlorure de mercure, une substance noire qu'il croyait analogue à une mélanine. Cette étude n'a pas été reprise à ma connaissance. Il ne peut s'agir que d'un produit artificiel.

C'est dans l'étude des processus, tels qu'ils se rencontrent chez les êtres vivants, qu'il y a lieu de rechercher l'explication de la mélanogénèse. La découverte de diastases amenant le noircissement des sucres chez les végétaux a ouvert cette voie féconde. (BERTRAND et BOURQUELOT, 1896). C'est à BERTRAND (1896) que revient l'honneur d'avoir, le premier, montré que le noircissement en question était dû à l'action d'un ferment, agissant sur la tyrosine par oxydation pour fournir des produits colorés, et de l'avoir différencié sous le nom de tyrosinase d'une autre oxydase très répandue chez les végétaux, la laccase. BOURQUELOT, à la même époque, contribua à faire connaître ce ferment en l'étudiant chez un grand nombre de champignons.

BIEDERMANN (1898) constata incidemment l'existence d'une tyrosinase analogue dans l'intestin du ver de farine (*Tenebrio molitor*). En 1901, VON FURTH et SCHNEIDER la retrouvent chez d'autres animaux et émettent l'hypothèse que la pigmentation noire lui est due. Cette hypothèse était séduisante, aussi, depuis cette date, une foule d'auteurs se sont efforcés de montrer chez les animaux l'existence de ce ferment, de déterminer sur quelle substance chromogène il agissait et dans quelles conditions s'accomplissait cette mélanogénèse. Mais si le premier point, c'est-à-dire l'existence de tyrosinase dans la série animale a pu être prouvée avec évidence, il reste encore bien des obscurités et même des lacunes sur la question de la nature du chromogène *in vivo* et des conditions de la pigmentation.

PRZIBRAM décrivit, en 1901, une tyrosinase dans la poche de la seiche et lui attribua le noircissement de l'encre des

céphalopodes. GESSARD, dès 1902, l'étudia à nouveau chez la seiche et reprenant les observations de PHISALIX sur la peau des grenouilles vertes et de DEWITZ sur les téguments de la larve de *Lucilia Cæsar* montra que le noircissement de leurs extraits étaient imputables à ce même ferment. Le même auteur répéta ces observations sur les tumeurs mélaniques du cheval, COTTE (1903), chez *Suberites domuncula*. Miss DURHAM (1905) réussit à extraire de la peau de jeunes mammifères une tyrosinase agissant en présence de sulfate de fer sur la tyrosine et donnant un précipité jaune lorsqu'elle provenait de peau brune, noire lorsqu'elle provenait de peau noire. La peau d'albinos ne lui fournissait pas de diastase. WEINDL (1907) mit en évidence le ferment dans la peau et les yeux des Céphalopodes adultes ainsi que dans les œufs encore incolores de *Loligo* et dans les tissus de *Proteus* non pigmenté.

GORTNER (1910) décrivit à nouveau la tyrosinase dans les téguments de la larve de *Tenebrio molitor*, chez *Cicada*, chez *Leptinotarsa decemlineata*, chez plusieurs myriapodes. Plus récemment, ONSLOW (1915), répétant les expériences de Miss DURHAM, ne put les confirmer. Cet auteur ne put extraire qu'une peroxydase agissant sur la tyrosine en présence d'eau oxygénée. La faculté qu'ont les extraits de peau d'oxyder les diphénols est due, d'après lui, à l'effet catalysant d'une matière colloïdale neutre plutôt qu'à une enzyme et il se base, pour affirmer ce fait, sur la résistance à des températures élevées.

BLOCH (1917) a mis en évidence dans la peau humaine en état de survie un ferment oxydant, thermolabile, n'agissant qu'en présence d'oxygène libre, nettement distinct de la polyphénoloxydase des leucocytes et absolument spécifique.

Il l'appelle dopaoxydase en raison de son action sur la dioxyphénylalanine ou dopa par abréviation.

J'ai moi-même montré (1920) l'existence chez les Crustacés décapodes d'une tyrosinase dont j'ai pu expérimentalement contrôler l'action sur les tissus des animaux eux-mêmes.

DE COULON (1920) a isolé dans des tumeurs mélaniques une

oxydase qui, en présence d'eau oxygénée, agit sur des phénols et détermine un précipité noir.

Préparation et caractère de la tyrosinase.

Il est aisé de se procurer une solution de tyrosinase, surtout en s'adressant aux végétaux. Les traités classiques de chimie biologique (BERTRAND) indiquent comment on peut en préparer à l'aide de champignons divers ou à l'aide de son. CHODAT et STAUB (1907) ont surtout utilisé une tyrosinase extraite des pelures de pommes de terre.

L'avantage de la tyrosinase de champignon et, en particulier de *RUSSULA*, est de ne point contenir de tyrosine, ce qui fait qu'elle reste toujours claire. La tyrosinase du son a pour elle l'avantage de ne pas être mélangée à une laccase. L'extraction du ferment consiste essentiellement en une macération dans de l'eau chloroformée puis, pour séparer la diastase des matières protéiques en une coagulation par l'alcool fort. La tyrosinase qui n'est que précipitée est reprise par de l'eau qui la dissout. Si l'on fait plusieurs coagulations de la solution de tyrosinase, elle devient rapidement inactive.

Pour extraire la tyrosinase de la poche du noir de la seiche, GESSARD prélève la glande du noir avec précaution, la broie avec du sable et la reprend par de l'eau chloroformée. Il obtient les mêmes résultats qu'avec les tyrosinases végétales. Il a pu encore caractériser la présence du ferment dans le produit commercial connu sous le nom de sépia en vessie et qui représente la poche du noir desséchée avec son contenu.

GORTNER a extrait par solution dans l'eau la tyrosinase contenue dans les téguments des cigales au moment de la formation de la cuticule. L'alcool était nuisible à ce ferment (1911).

J'ai pu obtenir facilement la tyrosinase que j'ai extraite de l'hypoderme des Crustacés en opérant comme GESSARD. Le tissu était broyé avec du sable, repris par l'eau chloroformée et la solution était centrifugée. Le liquide clair possédait toutes les réactions d'une tyrosinase. L'hypoderme, contenant des mélanophores en évolution, était

chez les Crustacés à mélanine la seule région d'où je puisse extraire le ferment.

Il est à remarquer que toutes les extractions de tyrosinase animale ont été faites sans intervention de l'alcool. Ce réactif les rend en effet inactives immédiatement. Et celle des Crustacés est dans le même cas. J'avais cru d'abord réussir à l'extraire après traitement de l'hypoderme par l'alcool fort (1920). Mais dans ce cas, elle persistait en raison de l'abaissement du degré de l'alcool par les liquides organiques. Si l'on met un grand excès d'alcool fort pour que la dilution soit peu sensible, il n'est plus possible de reprendre le ferment par l'eau.

Comme les tyrosinases connues, celle des Crustacés est sensible à la chaleur et perd ses propriétés vers 60°. Le chloroforme, le toluol, sont sans action sur elle tout en empêchant le développement des microorganismes. Les acides et les alcalis empêchent son action qui réclame un milieu neutre. Elle ne présente pas les réactions générales des oxydases. C'est donc bien une vraie tyrosinase, diastase oxydante mais à action assez étroitement spécifique.

Action de la tyrosinase.

Cette action porte principalement sur la tyrosine. C'est en raison de ce fait que BERTRAND lui a donné son nom. On sait que si l'on traite une solution de tyrosine par une tyrosinase, on obtient au bout d'un temps, variable suivant divers facteurs une série de colorations rose, rouge, violet ; finalement, il se forme un précipité noir qui se rassemble au fond du tube où a lieu la réaction.

On admet que la réaction consiste en une condensation avec oxydation du noyau tyrosine (VON FURTH et SCHNEIDER, 1901) ; la molécule du produit obtenu contiendrait le double d'azote que la tyrosine. WOLKOW et BAUMANN, GENNERMANN

et CZAPECK (d'après BATELLI et STERN, 1912) admettent qu'il y a une phase intermédiaire représentée par l'acide homogénisique. Plus récemment, CHODAT et SCHWEITZER (1913), ainsi que BACH (1914), admettent que l'action de la tyrosinase sur la tyrosine est représentée par une désamination qui précède l'oxydation de la fonction phénol.

On s'est demandé sur quelles substances, en dehors de la tyrosine, la tyrosinase était capable d'agir. Ce sont surtout les belles recherches de CHODAT et STAUB d'une part, de BERTRAND d'autre part, qui ont contribué à éclairer la question.

CHODAT et STAUB (1907), ont consacré une série de mémoires à la spécificité de la tyrosinase et à son action sur les produits de la dégradation des protéiques. Leurs conclusions principales, et les plus intéressantes à mon point de vue actuel, sont, que la tyrosinase est un ferment oxydant spécifique, agissant sur la tyrosine. Cette action est diminuée par la présence d'autres acides aminés. Mais en revanche la tyrosinase fournit également des produits colorés avec des polypeptides courts, contenant de la tyrosine et, dans ce cas, au contraire, l'action est favorisée par la présence d'acides aminés. La couleur des produits obtenus varie suivant la nature des acides aminés. Les auteurs ont expérimenté sur le glycytyrosine anhydride et sur la tyrosine anhydride. En présence de tyrosinase et d'acides aminés, il se produit une coloration rouge qui passe au vert bleu, s'il s'agit de glyco-colle; s'il s'agit de leucine la teinte rose est fugace et passe à un brun foncé intense. On peut, grâce à cette méthode, reconnaître la présence de peptides à tyrosine dans les produits de la digestion peptique.

Le pigment obtenu dans ces conditions est insoluble dans le chloroforme et l'alcool, soluble dans l'acide acétique et se dissout en rougissant dans les alcalis. Les auteurs ont constaté que la phénylalanine n'est pas modifiée par la tyrosinase et ils concluent que la spécificité n'est pas fonction du groupe amino-acide lié au noyau benzénique, mais qu'il faut

la chercher dans la position réciproque des groupes OH et amino-acide.

HARLAY (1900), avait déjà utilisé la tyrosinase de *Russula* pour l'étude des différents ferments protéolytiques : trypsine, pepsine, papaïne. Avec un produit de digestion de matières protéiques résultant de l'action de la trypsine, la tyrosinase donnait une teinte noire caractéristique et l'on trouvait parallèlement de la tyrosine dans le produit de digestion. Après action des autres ferments dont l'action protéolytique est poussée moins loin, la tyrosinase donnait seulement une teinte verte. Si l'on complétait la digestion par la trypsine, la coloration noire apparaissait.

BERTRAND (1908), sans avoir semble-t-il eu connaissance des travaux de CHODAT et STAUB, a examiné comment se comporte la tyrosinase vis-à-vis de diverses substances voisines de la tyrosine, dont plusieurs se rencontrent dans les cellules de l'organisme. Il arrive à la conclusion que seuls sont oxydables les corps renfermant un oxhydrile phénolique.

C'est sur ce point que doit porter vraisemblablement l'oxydation diastasique. La grandeur et la nature de la chaîne latérale paraissent n'avoir qu'une influence secondaire, sauf dans le cas où cette chaîne est aldéhydique, auquel cas il n'y a pas coloration. La glycylytyrosine est oxydée directement sans qu'il y ait dédoublement en glycocolle et tyrosine. Bertrand estime que dans l'organisme le jeu des réactions diastasiques auquel est soumis la matière protéique, doit tendre à donner la mélanine la plus simple, celle qui dérive de la tyrosine. Il est probable que dans d'autres cas l'oxydation doit porter sur des termes moins avancés de l'hydrolyse, sur des polypeptides renfermant parfois du soufre et même du fer. Les résultats divergents qu'ont fourni les analyses de mélanine doivent tenir à la nature du dérivé protéique qui subit l'action de la tyrosinase. Dans les composés sur lesquels la tyrosinase n'agit pas, il est vraisemblable d'admettre que l'oxhydrile phénolique sur lequel porterait l'oxydation est combiné.

ABDERHALDEN et GUGGENHEIM (1908), étudiant l'action de la

tyrosinase de *Russula delica* sur la tyrosine et les polypeptides à tyrosine, concluent également que la tyrosinase agit sur le polypeptide sans le dédoubler et que les acides aminés présents lors de la réaction participent à la formation de la matière colorante.

Plusieurs auteurs ont observé que la tyrosinase pouvait agir sur l'adrénaline (NEUBERG, 1908 — FUNK, 1912) et sur le tryptophane (NEUBERG-EPPINGEN, 1910).

Mode d'action de la tyrosinase. —

On a cherché à interpréter le mode d'action de la tyrosinase. Cette question se rapporte au mode d'action des oxydases en général, dont on n'a là qu'un cas particulier. Différents schémas en ont été donnés.

Le plus connu est celui de BERTRAND donné aussi par SPITZ. Ces auteurs considèrent l'oxydase comme une complémentaire activante associée à une complémentaire active qui est inorganique et représentée par un métal (fer ou manganèse). Ces complémentaires forment le couple catalytique en présence duquel l'oxygène réagit sur l'accepteur (polyphénol dans le cas des polyphénoloxydases, tyrosine dans le cas de la tyrosinase), pour donner un produit d'oxydation avec condensation moléculaire.

LINOSSIER, BACH et CHODAT (d'après LAMBLING, 1920) n'admettent pas la présence de métal dans l'élément catalytique, mais Bertrand a montré avec raison combien il est difficile de se mettre à l'abri de traces de métaux, surtout de fer. Dony-Hénault, par contre, nie l'intervention de la complémentaire organique, mais on n'explique pas ainsi que le ferment soit détruit par la chaleur. Sans entrer dans plus de discussions, je retiendrai la théorie de BERTRAND, qui rend bien compte des phénomènes et me servira de guide tout à l'heure.

Conditions de l'action la tyrosinase. —

La tyrosinase a besoin, pour agir sur un chromogène, de la réunion de certaines conditions. Nous venons de voir que sans oxygène la réaction ne peut avoir lieu, le ferment ne servant qu'à activer ce corps, peut-être en raison de la pré-

sence de fer. Un certain nombre d'autres conditions secondaires doivent aussi être réunies. Le milieu doit être neutre, la température doit atteindre un optimum qui paraît légèrement variable avec la provenance de la diastase. La lumière ne paraît pas avoir d'action *in vitro* ; la tyrosinase agit tout aussi bien à l'obscurité, toutes autres conditions étant remplies. Il semble que la présence de sels minéraux soit aussi nécessaire, tout au moins pour la précipitation de la mélanine. GESSARD (1901) a étudié l'action de différents sels. Il a constaté que la phase de précipitation qui apparaît à la fin, dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine, est sous l'influence des sels naturellement contenus dans les solutions. Les sels alcalino-terreux agissent plus fortement que les alcalins. Avec un excès de sels calcaires on arrive à supprimer l'apparition de la teinte rouge et le précipité noir se forme d'emblée. En même temps la présence des différents sels amène des retards considérables dans l'apparition de la réaction. AGULHON (1910) a étudié l'influence de la réaction du milieu sur la formation des mélanines par oxydation diastasique. Il a établi que les sels neutres à la phthaléine, mais alcalins à l'hélianthine étaient les plus favorables à l'action de la tyrosinase.

WOLFF (1910) a constaté qu'en présence de phosphate disodique il obtenait une mélanine noire, et grise en l'absence de ce sel.

PIETTRE (1911) a vérifié la nécessité de la présence de sels pour la précipitation des mélanines *in vitro*. Cet auteur a de plus étudié (1911) le produit qu'il appelle mélanine artificielle, résultant de l'action de la tyrosinase sur la tyrosine et a constaté que par sa composition, il se rapprochait des pigments naturels.

Recherche du chromogène *in vivo*. —

Si la présence de tyrosinase a été démontrée d'une manière générale chez les animaux, c'est surtout *in vitro* que l'on a étudié son action sur des chromogènes artificiellement préparés. On a supposé l'existence dans les tissus animaux

qui se mélanisent de chromogènes analogues, se formant aux dépens des produits de désintégration des matières protéiques. On a spécialement admis que c'étaient les produits de régression de l'hémoglobine qui, chez les Vertébrés, donneraient naissance à la mélanine. La présence de fer dans certaines de ces mélanines et la réaction de l'hémopyrrol donnée par elles semblent confirmer cette manière de voir au moins dans certains cas. Chez la plupart des Invertébrés qui sont privés d'hémoglobine, son origine est tout autre. D'une manière générale, on est pas arrivé à isoler et à identifier le chromogène d'une façon satisfaisante.

A ma connaissance, le nombre de travaux bio-chimiques concernant cette question est restreint.

VON FÜRTH et SCHNEIDER (1902) ont isolé dans le sang de Lépidoptères un chromogène qui n'est précipité ni par l'acide phospho-tungstique, ni par les sels des métaux lourds, ni par la solution de nitrate d'argent ammoniacale. Ils ont supposé que c'était un corps de la série aromatique, non identique à la tyrosine.

GESSARD (1903) a trouvé dans les tumeurs mélaniques du cheval un chromogène d'où il a pu extraire de la tyrosine cristallisée.

GORTNER (1910) a isolé des téguments de la larve de *Tenebrio molitor*, un corps présentant la réaction de Millon et donnant des colorants azoïques avec des composés diazo. Le même auteur a extrait du corps de la cigale, un chromogène donnant la réaction de Millon et noircissant par la tyrosinase (1911).

BLOCH (1917) s'est efforcé, chez les mammifères, de saisir, dans les tissus mêmes, la formation du pigment. Il a réussi à former une mélanine artificielle ou dopamélanine, en traitant des coupes congelées de peau humaine en état de survie, avec de la dioxyphenylalanine ou dopa. En contrôlant, à l'aide du microscope, il a constaté que le processus n'avait lieu qu'à des endroits et chez les individus normalement capables de former du pigment. On ne l'obtient pas avec de la peau d'albinos. BLOCH pense que sa dopaoxydase

agit dans l'organisme sur des substances de déchet, qui seraient éliminées ainsi sous forme de pigment.

HOLLANDE (1920) a vu une mélanine se produire dans les leucocytes du sang des chenilles au cours de la phagocytose. DE COULON (1920) injectant d'une part une solution de peroxydase, d'autre part de pyrocatéchine sous la peau de souris voit apparaître une tache pigmentée en noir.

Au point de vue morphologique, le mécanisme de la mélanogénèse a été étudié d'une manière plus approfondie. On trouvera un historique assez complet de cette question dans le travail de M^{lle} ASVADOUROVA (1913), spécialement pages 270 et suivantes. Il est à remarquer qu'un grand nombre d'auteurs admettent la présence de plaques pigmentaires, appelés *Pigmentbildner* par les auteurs allemands et représentant vraisemblablement le chromogène.

Chez les Batraciens, REINKE (1893 et 1894) soutient que les mélanophores sont le dernier stade de l'évolution de cellules remplies de granules pigmentaires, d'une « couleur de lavande » très analogues à ceux que j'étudie sous le nom de pigment amino-acide. LUBARSCH (1897) fait des constatations semblables. FLEMMING (1897) et FISCHER (1901) sont moins affirmatifs, bien que FISCHER décrive des éléments dont une moitié renferme des granules pâles et l'autre moitié des granules sombres. M^{lle} ASVADOUROVA a bien vu des cellules « couleurs de lavande » et les a appelées xanthocytes. Elle a constaté leur association avec les mélanophores. « On a l'impression, dit-elle, que l'une des deux espèces ne peut exister sans l'autre comme si elles étaient deux stades de l'évolution d'un même élément cellulaire ou deux éléments fonctionnellement associés ».

2° Origine de la mélanine chez les Crustacés Décapodes.

Je me suis efforcé, chez ces Crustacés, de combler la lacune qui existe entre les théories chimiques de la mélanisation et les données d'ordre purement morpho-

logique, de trouver le chromogène sous son aspect histologique et de le définir en même temps chimiquement.

Chez les Décapodes, la mélanine se forme aux dépens du pigment que j'ai désigné sous le nom de pigment amino-acide.

Cette affirmation résulte d'une série de faits et d'arguments, les uns morphologiques, les autres bio-chimiques.

Par un examen superficiel, on est frappé de voir que la mélanine n'existe jamais chez un animal sans le pigment amino-acide et que ce dernier est d'autant moins abondant dans une région que la mélanine l'est davantage.

A un faible grossissement, les chromatophores contenant l'un ou l'autre pigment donnent la même impression. C'est qu'ils ont même structure et les pigments, tous deux, sous forme de grains bien que de taille différente, ont une disposition analogue dans la cellule (Pl. I. fig. 1) Chez les embryons, la première cellule pigmentaire qui apparaisse est toujours un amino-acidophore. Le mélanophore lui succède. Enfin, en observant attentivement soit un étalement, soit mieux et avec plus de précision une coupe de l'hypoderme mélanisé, on voit que dans les cellules en train de se charger de mélanine, les deux pigments existent côte à côte. Grâce à la fixation dans l'alcool absolu, qui conserve, avec ses caractères, le pigment amino-acide, j'ai pu obtenir des coupes qui m'ont permis de suivre l'évolution de la mélanogénèse.

Si l'on examine une coupe mince de l'hypoderme de la face dorsale du céphalo-thorax d'un *Cancer pagurus* par exemple, on trouvera, à coup sûr, des séries de chromatophores où les deux pigments seront réunis.

Dans un amino-acidophore qui, après avoir pris naissance, comme on l'a vu, a émigré vers la surface, on voit vers le moment où il atteint cette surface, apparaître dans le pointillé de granules qui le remplissent, des grains, d'abord fins, à peine plus gros qu'un granule de pigment amino-acide, et qui vont en grossissant progressivement jusqu'à la taille d'un grain normal de mélanine. Cette apparition de mélanine commence par l'extrémité d'un chromorhize, situé près de la surface, ou par la région périnucléaire. Elle s'étend peu à peu à tout le contenu de la cellule. Il ne reste plus qu'un semis très réduit de granules amino-acides entre les grains noirs et ce semis disparaît bientôt complètement. (Pl. I., fig. 2, 3, 4).

Cette transformation peut se faire de deux façons. Elle peut avoir lieu dans un amino-acidophore isolé des autres qui donne ainsi naissance à un mélanophore isolé. Ou bien on peut voir, au milieu d'un réseau formé d'amino-acidophores, s'individualiser d'abord un mélanophore, le plus superficiel, puis les autres successivement.

Ces faits ont été observés par moi, en détails, sur *Cancer pagurus*, *Carcinus mœnas*, *Portunus puber*, *Pisa tetradon* et vérifiés sur tous les autres Décapodes à mélanine indiqués au Chapitre IV. Ils sont à rapprocher de ceux que PRENANT a observés dans les larves de Batraciens. Il est particulièrement intéressant de constater qu'étudiant des matériaux aussi éloignés, nous soyons arrivés à des résultats, en somme, identiques (1920).

A ces arguments morphologiques, il était indispensable d'apporter l'appoint d'une démonstration biologique et surtout chimique.

J'ai pu d'abord reproduire expérimentalement la transformation en mélanine de pigment amino-acide dans une région non mélanisée (1920). J'ai traité *in vitro*, par une solution de tyrosinase, un morceau d'hypoderme d'une telle région et obtenu, au bout d'un jour environ, la formation de grains de mélanine. Les pièces, complètement immergées, ne noircissaient pas, étant soustraites à l'action de l'air. Je fais remarquer que cette expérience n'a rien de cytologique, en raison de la mort du protoplasma. Pour qu'elle réussisse, il faut qu'il y ait un commencement de dissolution du pigment amino-acide. C'est à cette seule condition qu'un contact immédiat peut s'établir entre ce dernier et la tyrosinase, qui est ici exogène, alors que chez l'animal vivant, l'action du ferment est intra-cellulaire. L'expérience n'en est pas moins démonstrative. Le pigment amino-acide disparaît et l'on voit se déposer à la place des chromatophores, dont les contours deviennent flous, des grains ayant tous les caractères des grains de mélanine que l'on observe dans les tissus où ils se forment normalement : insolubilité dans l'eau, résistance aux acides dilués, dissolution dans les alcalis. Du reste, cette formation expérimentale de mélanine peut être également réalisée, non plus sur le tissu même, mais sur son extrait aqueux, ainsi que le fait a été signalé en étudiant le pigment. Tyrosinase et chromogène sont là en contact immédiat.

Pour rendre plus saisissante cette transformation du pigment amino-acide en pigment mélanique, je me suis efforcé de trouver une méthode qui me permette de la suivre chimiquement. Je l'ai exposée dans une note. J'y reviendrai ici plus longuement.

Étant donné, comme on l'a vu, que la méthode au

formol de SCHIFF permet de doser l'azote aminé du pigment, j'ai pensé qu'en l'appliquant à différentes régions de l'hypoderme, plus ou moins mélanisées, on pourrait étudier les variations de cet azote aminé. La mélanine à l'état pur, telle qu'elle est isolée par les différentes méthodes chimiques, ne contient plus traces d'azote dosable au formol, c'est-à-dire d'azote aminé. On le comprendra puisque l'on sait (CHODAT, 1913), que l'action de la tyrosinase sur la tyrosine qui est généralement le chromogène en question, est considérée comme une action de désamination avant d'être une action d'oxydation.

Ainsi, il était à prévoir que, si la mélanine, dérivait bien du pigment amino-acide, on assisterait au fur et à mesure de la formation de mélanine dans un tissu au moins à une diminution du taux de l'azote aminé représentant le pigment amino-acide.

On constate morphologiquement que plus une région se mélanise, plus le nombre des amino-acidophores diminue.

Les résultats chimiques, conduits parallèlement à l'observation histologique, viennent confirmer l'hypothèse et la constatation morphologique que je viens d'énoncer.

J'ai appliqué la méthode du dosage, telle que je l'ai indiquée au sujet de l'étude chimique du pigment amino-acide, mais j'ai pratiqué les dosages sur des régions qui se montraient plus ou moins riches en mélanine.

J'ai opéré les dosages sur les mêmes individus chez qui j'avais dosé l'azote aminé dans les régions où le pigment amino-acide est à l'état pur.

NOM DE L'ANIMAL	AZOTE AMINÉ EXPRIMÉ EN GRAMMES POUR CENT GRAMMES DE TISSU		
	Région non mélanisée	Région très mélanisée	Régions intermédiaires
CANCER N° 1	0, 224	0, 074	0, 130
CANCER N° 3	0, 220	0, 105	0, 170
CANCER N° 5	0, 228	0, 120	0, 180
PORTUNUS	non dosé	0, 125	0, 170
CARCINUS N° 1 . . .	0, 247	0, 110	»
CARCINUS N° 2 . . .	0, 249	0, 105	»
CARCINUS N° 3 . . .	0, 280	0, 102	»

Chez *Portunus*, la région où les amino-acidophores sont à l'état pur étant trop réduite, je n'ai pu en obtenir de dosage.

A l'inspection de ce tableau on constate que, alors que par exemple, chez *Cancer*, le taux d'azote aminé est sensiblement constant dans les régions où les amino-acidophores sont seuls, il varie dans les autres régions avec les progrès de la mélanisation, diminuant considérablement là où le microscope montre la mélanine abondante. Il n'est pas possible d'obtenir une région où les mélanophores soient à l'état pur. Ainsi que je l'ai décrit, de nouveaux amino-acidophores se forment constamment dans les couches profondes de l'hypoderme et sont en évolution vers la surface. Aussi trouve-t-on toujours

l'azote aminé représenté. Il n'est donc pas possible de savoir si la mélanine telle qu'elle existe *in vivo* contient encore un résidu amino-acide soluble.

La mélanine extraite s'en montre dépourvue, mais il n'y a pas là de preuve, car il peut y avoir un faible résidu joint à la mélanine, qui serait dissous au cours de l'extraction de cette dernière. Les résultats de PIETTRE chez les mammifères, ont montré qu'il reste à côté du noyau pigmentaire, un noyau de corps à fonction amino-acides, mais de nature protéique, conclusion que je n'ai pas vérifiée chez les Crustacés. Il se peut chez ceux-ci, comme je l'indiquerai plus loin, qu'il reste un noyau de pigment amino-acide entouré par la mélanine formée.

J'ai pu reproduire expérimentalement cet abaissement du taux de l'azote aminé en faisant agir une tyrosinase sur l'extrait aqueux de pigment amino-acide. Cet abaissement peut être obtenu également en traitant une solution de tyrosine. Un volume donné de l'extrait aqueux est exactement divisé en deux portions. Dans l'une on dose, par la méthode connue, l'azote aminé. L'autre portion est traitée par quelques gouttes d'une solution de tyrosinase (de champignon ou de son, par exemple). Au bout de quelques heures, il s'est formé un précipité de mélanine. On recueille, par filtration, le liquide resté clair, on lave le filtre et l'on dose l'azote aminé dans ce liquide clair. Il faut avoir soin de déterminer la quantité d'azote aminé introduite du fait de l'addition de la tyrosinase, en la dosant sur un volume équivalent au volume ajouté. Cette quantité, d'ailleurs faible, est retranchée du chiffre obtenu dans le dosage après action du ferment.

Il va sans dire que si l'on chauffe à 80°, le tube contenant le mélange extrait aqueux et tyrosinase, la mélanisation n'a pas lieu.

CANCER PAGURUS [N] aminé en grammes pour cent de tissus.	Pigment amino-acide pur	Après action de la tyrosinase
	0,224	0,0885
	0,212	0,099
	0,230	0,127

On voit que le taux de l'azote aminé baisse considérablement et que cet abaissement est tout à fait comparable à celui que l'on constate chez l'animal d'une région non mélanisée à une région mélanisée. Il reste une petite quantité d'azote aminé, mais qui ne semble pas dû à la tyrosine, puisque le liquide n'en donne plus la réaction. PIETTRE (1911), dans la mélanisation de tyrosine *in vitro*, avait toujours un résidu assez important de tyrosine non condensée. BERTRAND admet que le pourcentage du rendement est de 60 % dans la transformation de tyrosine en mélanine. AGULHON, en présence de phosphate disodique, atteint un pourcentage de 78 %.

Ainsi l'azote aminé baisse fortement avec les progrès de la mélanisation. Il était intéressant de chercher à savoir ce que devient l'azote total. Il ne devrait théoriquement que peu varier. L'azote des groupements aminés disparaissant de ces groupements, mais non de la mélanine formée. J'ai indiqué, au sujet du pigment

amino-acide, quelle était la teneur de cet azote total dans les régions où les amino-acidophores sont à l'état pur. Dans une région mélanisée, une partie du pigment s'est fixée à l'état insoluble, sous forme de mélanine, l'autre partie restant soluble. Aussi, pour connaître le taux d'azote total pigmentaire dans une telle région, y a-t-il une double opération à faire. Il faut, d'une part, connaître l'azote total du pigment amino-acide restant dans cette région, d'autre part, connaître l'azote total que représente la mélanine formée dans cette même région. La somme de ces deux azotes représentera l'azote total pigmentaire d'origine protéique de la région. La recherche de l'azote total du pigment amino-acide se pratique sur l'extrait aqueux, comme je l'ai indiqué précédemment. J'ai montré, à propos de la mélanine, comment j'étais arrivé à doser l'azote total de ce pigment. Le tableau suivant indique les résultats obtenus chez *Cancer pagurus* :

	AZOTE TOTAL PIGMENTAIRE		Décomposable dans la région mélanisée en :	
	Région à pigment amino-acide pur	Région mélanisée	Extrait amino acide	Mélanine
CANCER PAGURUS N° 2	0 gr. 613	0 gr. 600	0 gr. 405	0 gr. 195
CANCER PAGURUS N° 4	0 gr. 598	0 gr. 590	0 gr. 410	0 gr. 180

Comme le prévoyait la théorie, le taux de l'azote pigmentaire d'une région mélanisée comparé à celui d'une région qui ne l'est pas, est sensiblement constant. Le produit extrait par la méthode d'ABEL et DAVIS représente bien la mélanine. S'il existe dans les grains de mélanine un noyau

secondaire, il en est séparé par l'extrait aqueux ou résiste au traitement chimique. Toute la substance pigmentaire est obtenue dans ces deux opérations.

Si l'on rapproche maintenant de ce tableau les chiffres représentant l'azote aminé, on voit que, dans le cas du Cancer n° 2 par exemple, l'azote aminé de la région non mélanisée étant égal à 0 gr. 212, celui de la région mélanisée, qui était assez étendue, étant égal à 0 gr. 145, 0 gr. 067 d'azote aminé ont disparu dans la formation de la mélanine. Cette dernière représentant 0 gr. 195 d'azote, on a ainsi la preuve qu'à sa formation prend part non seulement l'azote aminé, mais l'azote restant que j'ai défini au chapitre du pigment amino-acide et qui, dans le cas présent, représente 0 gr. 195 — 0,067, soit 0 gr. 128. Ce résultat indique que c'est un corps contenant plusieurs atomes d'azote qui est fixé lors de la formation de la mélanine et vraisemblablement, comme je l'ai supposé, ayant les fonctions de polypeptide à chaîne courte.

Interprétation. — Cette considération m'amène à me demander quel est le corps dont la présence dans le pigment amino-acide permet la transformation en mélanine par l'oxydation diastasique.

Les auteurs sont d'accord pour admettre que les amino-acides en chaîne linéaire ne sont pas oxydés par la tyrosinase mais que, au contraire, l'acide amino-cyclique qu'est la tyrosine l'est, en raison du reste, d'après CHODAT et d'après BERTRAND, de la présence de l'oxhydre phénolique. Si la tyrosine est enchaînée à d'autres molécules qui peuvent être des amino-acides linéaires, ces corps prennent part, du même coup, à la condensation qui résulte de l'oxydation de la tyrosine.

Ainsi, si le pigment amino-acide est oxydable par la tyrosinase il est à présumer que ce sera en raison de la présence, parmi les corps qui composent sa ou ses molécules, de l'amino-acide cyclique tyrosine auquel peuvent être joints d'autres amino-acides quelconques.

J'ai montré, en étudiant le pigment amino-acide, qu'il contenait de la tyrosine, décelable par diverses réactions, celle de MILLON notamment, mais non libre puisqu'on ne peut mettre ses cristaux en évidence qu'après une courte hydrolise.

Pour démontrer que l'oxydation portait bien sur cette tyrosine, au cours de la formation de la mélanine, j'ai pensé qu'on ne devait plus pouvoir la mettre en évidence après action de la tyrosinase, naturellement ou artificiellement, sur le pigment amino-acide.

En effet, alors que l'extrait aqueux d'une région, riche en amino-acidophores, donne fortement la réaction de MILLON, celui d'une région presque complètement mélanisée ne la donne pour ainsi dire pas et ne noircit pas par la tyrosinase. Si l'on fait agir *in vitro* de la tyrosinase sur l'extrait aqueux amino-acide comme je l'ai indiqué plus haut, à la suite de la précipitation de la mélanine, la tyrosine ne devient plus décelable.

L'oxhydrile phénolique de la tyrosine oxydée par la diastase n'est plus décelable. Selon la conception de CHODAT, cette oxydation est précédée d'une désamination et l'on assiste à la diminution de l'azote aminé, qui permet véritablement de suivre les progrès de la mélanisation d'une manière autrement plus précise qu'on ne le ferait en appréciant colorimétriquement la disparition de la réaction de MILLON.

J'arrive ainsi à la conclusion que la mélanine des

Crustacés décapodes dérive de l'oxydation du pigment amino-acide. Ce pigment représente un complexe de corps à fonctions amino-acides, unis en une chaîne assez courte, dans laquelle la tyrosine est présente et occupe une situation telle que la tyrosinase peut la désaminer et l'oxyder.

Les autres amino-acides présents se trouvent également condensés dans cette action et la variété des mélanines tient à la variété de ces corps. CHODAT et STAUB ont montré que, suivant les amino-acides présents, le produit d'oxydation prenait des teintes variées. Ainsi, je pense, peut-on expliquer la coloration violette de la mélanine de *Crangon* ou la coloration bleue de celle de *Pisa*.

Étude critique de la mélanogénèse.

Maintenant que la mélanogénèse des Crustacés est connue dans ses lignes générales, il me reste à en faire un examen critique, pour en retrouver cytologiquement les différentes phases et pour montrer comment sont réunies les conditions nécessaires à son accomplissement.

J'ai indiqué plus haut le schéma de BERTRAND-SPITZA qui rend compte du mode d'action d'une oxydase en général. PRENANT s'est déjà efforcé (Cours magistral 1920) d'appliquer ce schéma à la formation théorique de la mélanine sous la forme suivante.

Couple catalytique. . . .	{	Complémentaire active (= substance pigmentative, fer.)
		Complémentaire activante (= substance pigmentante, tyrosinase.)

+ Oxygène + Accepteur (= Produit de régression des protéiques).

= Produit d'oxydation avec condensation moléculaire (= Pigment mélanique).

J'ai pris cette hypothèse de travail, comme guide dans mon étude critique de la formation de la mélanine, chez les Décapodes.

Je vais m'efforcer de retrouver comment sont réunis les différents termes dont l'aboutissant est la mélanine. J'étudierai ensuite comment sont réalisées les conditions adjuvantes.

Accepteur. — C'est évidemment l'élément essentiel de la réaction, puisque c'est le support de l'action chimique. Je ne m'attarderai pas sur lui. J'en ai déjà longuement parlé puisqu'il n'est autre que le pigment amino-acide lui-même et plus spécialement dans ce pigment la molécule de tyrosine qui s'y trouve enchaînée. Morphologiquement, l'accepteur est, chez les Crustacés, représenté par les granules en suspension dans le cytoplasma des amino-acidophores. Cet aspect morphologique n'a pas de signification, car chez d'autres animaux, l'accepteur peut être sous une forme bien différente, témoins les observations de von SZILY sur le pigment mélanique de l'œil des embryons de vertébrés, où l'accepteur a toujours une origine nucléaire (1911); témoins celles de PRENANT qui, dans la rate de *Scyllium* voit se mélaniser des bourgeons nucléaires. La condition indispensable, comme j'y reviendrai, est une condition chimique : la présence de produits de régression des matières protéiques, contenant de la tyrosine et à un stade d'hydrolyse assez avancé.

A ce propos il est bon de remarquer que l'action de la tyrosinase doit être précédée de l'action d'un ferment hydrolysant. Tel est l'avis de SALKOVSKY et JACOBY qui pensent qu'il y a une destruction autolytique de l'albumine avant l'action de la tyrosinase. BERTRAND et MUTTERMILCH arrivent à une conclusion identique en étudiant le brunissement du pain bis. Sous l'influence d'un ferment protéolytique se forme un chromogène semblable à la tyrosine. Dans une deuxième phase la tyrosinase oxyde le chromogène.

Il est certain que le chromogène, qu'il soit pigment amino-acide ou autre, résulte d'un processus protéolytique dans l'organisme.

Couple catalytique. — Si l'on admet le schéma de BERTRAND, le ferment catalyseur comprend un couple : une complémentaire activante qui est la tyrosinase proprement dite et une complémentaire active minérale qui dans la plupart des cas est le fer.

Dans le cas de la mélanogénèse chez les Décapodes, la complémentaire activante, substance pigmentante de PRENANT, est facile, bio-chimiquement, à mettre en évidence sous les caractères d'une tyrosinase, analogue à celle que l'on a pu retirer d'autres animaux et que j'ai étudiée plus haut. Morphologiquement cette substance pigmentante ne paraît pas représentée. Mlle ASVADOUROVA s'est efforcée de la retrouver chez les Amphibiens, dans des boules colorables à l'état vivant, qu'elle a pu mettre en évidence au sein de réseaux de chromatophores, en voie de mélanisation. Mais ces boules colorables vitalemment ne sont pas une formation constante. Je ne les ai jamais retrouvées à aucun stade chez les Crustacés et

PRENANT a également constaté qu'elles manquaient chez plusieurs Amphibiens. Je crois du reste qu'il est vain de vouloir retrouver, sous un aspect figuré, toutes les substances chimiques contenues dans la cellule. L'histologiste doit évidemment le faire chaque fois qu'il le peut : mais il faut tenir compte de ce que le suc cellulaire contient, sous un aspect amorphe, la plus grande partie des composés qui entrent en réaction dans le cytoplasma (1).

La complémentaire active, substance pigmentative de PRENANT, est représentée par le fer. Mlle ASVADOUROVA avait émis l'hypothèse que le cuivre, en raison de sa présence dans l'hémocyanine, pouvait jouer ce rôle chez les Crustacés. Je n'ai pu arriver à le mettre en évidence dans les chromatophores, non plus que le manganèse ; il est vrai que les réactions de ce dernier sont délicates. Le fer fait partie, peut-on dire, de tout protoplasma vivant et se retrouve naturellement dans les chromatophores. Aussi est-il facile d'admettre sa présence dans le couple catalytique. J'ai montré que ce métal ne faisait point partie du pigment amino-acide, ni de la mélanine des Crustacés. Il y a là une distinction à établir. Le fer peut être présent à deux titres au cours de la mélanogénèse. Il peut faire partie de l'accepteur, comme ce paraît être le cas chez les animaux où la mélanine résulte de la désintégration de l'hémoglobine ; il est alors relativement abondant et se retrouve dans la mélanine, qui est une mélanine ferrugineuse. Mais le fer peut aussi ne pas faire partie de l'accepteur, comme c'est le cas chez les

(1) Les réactions histochimiques pour la recherche des oxydases ne sont pas applicables à la tyrosinase.

Crustacés, et jouer seulement un rôle de catalyse lors de l'action du ferment tyrosinase sur l'accepteur. Il est dans ce cas en quantités infinitésimales. J'ai cherché d'où il pouvait provenir et je pense qu'il reconnaît une origine nucléaire, le noyau, et plus spécialement la chromatine contenant, comme on le sait, la presque totalité du fer cellulaire.

J'ai fait remarquer, en étudiant les amino-acidophores que l'on observait fréquemment des figures de division amitotique, surtout dans les cellules sur le point de se mélaniser. J'ai utilisé la méthode de MACALLUM au bleu de Prusse, pour la mise en évidence du fer histochimiquement. Après plusieurs essais infructueux, j'ai obtenu des résultats en procédant à un démasquage du fer, sur les coupes fixées à l'alcool absolu, par l'alcool absolu contenant 2 % d'acide sulfurique chimiquement pur, à une température de 25° pendant une durée de trois heures. Dans ces conditions, le fer nucléaire devient visible comme MACALLUM l'a observé (1895). Étant donné la délicatesse de la méthode, je donne ces résultats sous toutes réserves.

La méthode et les résultats de MACALLUM ont été considérés comme sujets à caution, notamment par WIENER (1916) en raison des très nombreuses causes d'introduction accidentelle de fer dans les préparations.

Les amino-acidophores montrent le bleu de Prusse sous forme de piqueté, dans leurs noyaux, la chromatine y étant répartie en grains. C'est dans les cellules en voie de mélanisation que les images deviennent intéressantes. Leurs noyaux montrent des amitoses et à un moment donné ne présentent plus la réaction du fer, qui apparaît à ce moment dans le cytoplasma. Après la mélanisation,

quelques traînées bleues apparaissent encore entre les grains de mélanine formée, surtout à la zone, où la transition se fait avec la région non encore mélanisée dans le cytoplasma, puis le fer ne devient plus décelable dans ce dernier et réapparaît dans le noyau qui donne à nouveau la réaction du bleu de Prusse, mais paraît alors homogène, uniformément bleu. Ces résultats m'ont paru dignes d'être rapportés car ils sont extrêmement voisins de ceux obtenus par SCHULTZE et BORN (d'après MACALLUM) sur les œufs d'Amphibiens où le fer des sphérules vitellines a une origine nucléaire. Il est à supposer que, au cours des amitoses, le fer fixé sur la chromatine, ou une partie de ce fer, passe dans le cytoplasma et vient former avec la tyrosinase un couple catalytique endo-cellulaire qui déterminera l'oxydation du pigment amino-acide.

Oxygène. — Le ferment ne joue que le rôle d'intermédiaire, il agit par catalyse et sert à activer l'oxygène qui doit être présent dans le milieu où se fait la réaction. C'est là un fait reconnu. DEWITZ (1902) a observé que si on les soustrait à l'influence de l'air, les pupes de mouches, qui se mélanisent normalement, restent blanches; seules les parties qui sont à l'air se colorent. GESSARD (1904) a fait des observations analogues sur la mouche dorée. J'ai remarqué (1920) en mélanisant expérimentalement l'hypoderme des Crustacés, que les pièces immergées dans la solution de tyrosinase, et par conséquent à l'abri de l'air, ne noircissaient pas.

Or, il est à remarquer que chez les Décapodes, les amino-acidophores ne se mélanisent qu'au moment où ils arrivent tout à la surface, en contact avec les cellules épidermiques et s'insinuant entre elles. Elles sont alors

au voisinage presque immédiat de l'air atmosphérique ou de l'air dissous dans l'eau, dont les sépare seulement la carapace qui, non seulement est perméable aux liquides et aux gaz, mais en raison de sa structure poreuse est sans doute capable de condenser ces derniers par adsorption. Peut-être aussi le couple catalytique ne se forme-t-il que dans les couches toute superficielles de l'hypoderme.

Il est difficile de préciser le mécanisme cytologique de la formation même des grains de mélanine. Il est probable qu'il y a, au moment de l'action de la tyrosinase, dissolution superficielle de chaque granule de pigment amino-acide, puis précipitation de mélanine autour du granule dont le centre pourrait rester intact. La précipitation doit se faire par dépôts successifs, ce qui explique le grossissement des grains de mélanine et leurs tailles inégales. On peut aussi admettre que la précipitation de la mélanine a lieu entre les granules de pigment amino-acide.

Etude des conditions adjuvantes de la mélanisation

A côté des facteurs essentiels que jé viens d'étudier, la formation de mélanine nécessite la réunion de plusieurs facteurs secondaires, que j'ai brièvement indiqués dans l'étude de l'action de la tyrosinase *in vitro*. Voyons quels sont les facteurs qui paraissent nécessaires à la mélanogénèse *in vivo*. M^{lle} ASVADOUROVA a exposé dans son travail l'historique de cette question. Aussi ne ferai-je ici qu'étudier comment ces facteurs sont réunis chez les Décapodes en indiquant en chemin mes idées personnelles sur ce point.

Lumière. — J'ai montré que lorsque, dans un milieu, tyrosinase et chromogène se trouvaient réunis, en présence d'oxygène et toutes autres conditions réalisées (neutralité, température), la lumière n'avait aucune influence sur le phénomène qui se passait aussi bien à l'obscurité. Et pourtant, c'est une constatation d'une grande vulgarité que celle de l'influence des radiations lumineuses sur le développement de la pigmentation mélanique. C'est donc, puisqu'elle n'agit pas sur la réaction même, qu'elle fait apparaître un de ses facteurs.

Elle doit, ou bien activer l'hydrolyse des matières protéiques qui aboutit à l'apparition du chromogène convenable, ou bien faire apparaître le ferment tyrosinase. Elle peut enfin agir *in vivo* par ses radiations calorifiques en réalisant le facteur température.

Si l'on examine un individu de *Cancer pagurus*, on constate que la mélanisation, comme je l'ai dit, est nettement localisée aux zones vivement éclairées. Etant donné le peu d'activité de l'animal, les régions ventrales ne reçoivent, pour ainsi dire, jamais la lumière directement et elles ne montrent dans leur hypoderme que des amino-acidophores. Or l'extrait aqueux de ces amino-acidophores, traité par une solution de tyrosinase, est directement mélanisé *in vitro* même à l'obscurité. C'est donc que le chromogène convenable y préexiste et n'apparaît pas sous l'action de la lumière. Au contraire, alors que l'on peut extraire une tyrosinase des régions mélanisées de l'hypoderme, cette extraction est impossible dans les régions où le pigment amino-acide est seul.

Cette observation porte à croire que les radiations lumineuses règlent l'apparition de la tyrosinase ou d'une manière plus générale du couple catalytique. Cette

opinion est confirmée par le fait que j'exposerai dans un instant que chez les Décapodes sans mélanine, mais vivant à la lumière, il existe une tyrosinase, mais qu'il n'y a pas de chromogène oxydable par elle.

WEINDL (1907) a mis en évidence de la tyrosinase dans les œufs de *Loligo* avant l'apparition de la mélanine, ce qui cadre avec mes données, ces œufs étant exposés à la lumière. Mais il en a trouvé aussi dans les tissus de *Proteus*, animal non pigmenté et vivant à l'obscurité; la mélanine apparaît lorsque le Protée vit à la lumière. Dans ce cas, on ne peut admettre que l'action de la lumière par ses rayons calorifiques, les éléments, qui reçoivent directement les rayons solaires, accumulant une quantité de chaleur, supérieure à celle qui se trouve dans le milieu et nécessaire à la mélanogénèse *in vivo*.

LUTZ (1917) pense que l'oxydase qui forme le pigment est activé par des rayons divers; il a expérimenté les rayons de la lampe de quartz, de Röntgen, de thorium, et que ce ferment peut, sous leur action, apparaître dans des éléments cellulaires qui, auparavant ne présentaient pas la doparéaction de Bloch, dont j'ai parlé plus haut.

Chaleur. — On a pu, du reste, démontrer expérimentalement *in vitro* et contrôler par de nombreux faits *in vivo* (FISCHEL, 1896; FLEMMING, 1897) l'influence des plus nettes de la température. Il existe un optimum, qui peut fort bien n'être réalisé chez l'animal que par l'apport des rayons rouges du spectre.

Présence de sels minéraux. — En mettant à part le fer, qui joue un rôle direct dans la formation du couple catalytique, j'ai montré plus haut, que spéciale-

ment la présence de sels alcalino-terreux était indispensable pour la formation du précipité de mélanine *in vitro*. Ces sels sont abondamment répandus dans les tissus des Crustacés, surtout dans l'hypoderme et il est aisé de se rendre compte qu'ils doivent exercer leur influence sur la précipitation du pigment mélanique. On peut même comprendre, d'après l'observation de GESSARD que j'ai rapportée, que, en présence de ces sels calcaires, le précipité noir se produise d'emblée, sans que l'on voit apparaître la teinte rose intermédiaire, que l'on observe *in vitro* en l'absence de ces sels. HARLAY (1900) rapporte une observation de BOURQUELOT qui a vu, en solution légèrement alcaline, la tyrosine combinée par sa fonction acide, se colorer lentement en noir sans formation de couleur rouge.

Il est à peu près impossible de se rendre compte de la durée du processus de mélanisation. Il est probable qu'elle est longue, étant donnée la présence de sels et de composés organiques dont on a démontré *in vitro* l'action, retardant, parfois jusqu'à quinze jours, l'apparition du précipité de mélanine.

2^e Partie. — Décapodes sans mélanine.

La série pigmentaire azotée, d'origine protéique, ne comprend chez eux qu'un terme : un pigment amino-acide qui n'évolue jamais en mélanine. Je décrirai les caractères de ce pigment en signalant quelles ressemblances et quelles différences il comporte avec celui des Décapodes mélaniques. Je m'efforcerai ensuite de saisir pour quelles raisons il ne se transforme pas en mélanine.

Répartition zoologique. — Les Décapodes privés de mélanine d'une manière normale sont : les Macroures (sauf *Crangon*), les Anomoures.

Technique. — L'objet de mes recherches a été plus spécialement *Astacus fluvialilis* et *Homarus vulgaris*. Les techniques utilisées ont été les mêmes que pour le pigment amino-acide des Décapodes mélaniques.

Répartition et anatomie microscopique. — Ce qui frappe tout de suite lorsque l'on examine l'hypoderme d'un homard ou d'une écrevisse, c'est la faible densité des amino-acidophores en comparaison de ce qu'elle est chez *Cancer pagurus* par exemple. Jamais, comme chez ce dernier, ces éléments ne forment d'amas, ni de réseaux ; ils sont toujours isolés, clairsemés. Il est rare d'en rencontrer sur plus de deux couches étagées en profondeur et leur évolution si facile à suivre chez les Crustacés à mélanine l'est beaucoup moins ici. Le processus de formation du pigment amino-acide est peu actif, bien qu'il ne manque jamais.

Histologie des Chromatophores et morphologie du produit pigmentaire. — S'il y a des différences dans la disposition des amino-acidophores, il y en a aussi dans leur histologie. On a toujours à faire, chez les Décapodes non mélaniques, à des éléments simples. Ce sont des cellules étoilées, de dimensions assez réduites ne dépassant généralement pas 75 μ avec leurs chromorhizes et ne s'anastomosant pas avec leurs voisines. Le noyau est unique dans la plupart

des cas. Je n'ai jamais observé les phénomènes d'amarose que j'ai décrits à propos des Décapodes à mélanine.

Morphologiquement, au contraire, le pigment a une assez grande ressemblance avec celui de ces Crustacés. Sa teinte, au lieu d'être jaunâtre, tire plutôt sur le gris, mais il a le même aspect réfringent. Sa texture examinée avec un objectif à immersion est analogue. On voit un semis de granulations régulièrement arrondies, extrêmement fines, peut-être encore plus petites et à la limite du pouvoir définissant de l'objectif employé.

Nature du pigment. — Ayant constaté pour ce pigment des réactions générales semblables à celles du pigment amino-acide des Crustacés mélaniques, j'ai employé les mêmes méthodes d'étude chimique.

Les caractères de solubilité sont en gros les mêmes. Cependant la solubilité dans l'eau froide paraît plus facile et plus rapide, peut-être à cause de la moins forte densité des chromatophores.

J'ai pu dans les mêmes conditions obtenir un extrait aqueux de ce pigment, en observant des précautions identiques, c'est-à-dire essentiellement en traitant par l'eau bouillante après broyage et coagulation par l'alcool absolu de l'hypoderme frais.

C'est l'étude de cet extrait aqueux qui va surtout nous révéler les différences existant entre les deux sortes de pigments amino-acides. La recherche de composés puriques et d'urée est négative. La réaction du formol est toujours positive, mais la réaction du biuret donne une coloration rose-mauve. L'addition de sulfate d'ammonium en solution concentrée, fait apparaître un trouble et le réactif de TANRET donne aussi un louche.

Les dosages d'azote aminé donnent les chiffres suivants, dans l'hypoderme du céphalo-thorax.

NOMS DES GENRES	N aminé en grammes pour cent de tissu	NOM DES GENRES	N aminé en grammes pour cent de tissu
HOMARUS 1 . . .	0,105	ASTACUS 1 . .	0,090
HOMARUS 2	0,090	ASTACUS 2 . .	0,080
HOMARUS 3	0,100	NEPHROPS . .	0,070
EUPAGURUS	0,140	DROMIA	0,120

L'hypoderme d'un homard ou d'une écrevisse est mince relativement à ce qu'il est chez le tourteau ou le crabe par exemple. Son poids, pour une même surface, est environ trois fois plus faible que celui de l'hypoderme des Brachyours. Malgré cette minceur de l'hypoderme, le taux de l'azote aminé est inférieur environ de moitié à celui des Crustacés mélaniques. Alors que, chez ces derniers, le taux d'azote aminé est essentiellement variable, puisque dans les régions éclairées il s'abaisse par suite de la formation de mélanine, chez les Décapodes sans mélanine ce taux est le même, que l'on s'adresse à une région éclairée ou non.

Recherche qualitative. — La réaction xanthoprotéique est positive ; celle de MILLON l'est aussi, mais elle est moins belle que pour les Décapodes à mélanine. Par contre, l'addition d'une solution de tyrosinase n'amène jamais de noircissement du liquide. L'acide phosphotungstique donne un précipité.

Explication de la non formation de mélanine. — C'est dans l'interprétation du résultat de mes observations que nous trouverons la réponse à la question, pourquoi ne se forme-t-il pas de mélanine chez les Décapodes que j'étudie en ce moment ?

Mais grâce à l'analyse du processus de la mélanogénèse que j'ai faite dans le chapitre précédent, le raisonnement va nous conduire à la conclusion que confirmera la réalité des faits.

La formation de mélanine réclame la présence d'un accepteur ou chromogène, d'un ferment, d'oxygène et de diverses conditions adjuvantes. Il existe, dans l'hypoderme des Crustacés sans mélanine, un ferment oxydant la tyrosine libre *in vitro*. WEINDL l'a signalé chez *Astacus*, je l'ai moi-même retrouvé chez *Homarus*, *Astacus*, *Palaemon* entre autres. La présence d'oxygène et les autres conditions se trouvent tout aussi bien réalisées que chez les Crustacés à mélanine.

Toutes conditions égales d'ailleurs, il se déduit donc que le facteur déficient pour la formation de mélanine, c'est le chromogène. Le fait seul qu'*in vitro*, la solution du pigment amino-acide n'est pas oxydée par une tyrosinase, toutes les autres conditions étant réunies, est la meilleure confirmation de cette conclusion.

Il s'agit maintenant de s'efforcer d'expliquer l'absence du chromogène dans un pigment qui offre au premier abord des ressemblances avec un autre pigment qui, lui, contient ce chromogène.

L'existence de la réaction du biuret, de celle de TANRET et la précipitation par le sulfate d'ammoniaque, vont nous fournir cette explication.

Les corps qui composent le pigment amino-acide, des

Crustacés sans mélanine, représentent des molécules à chaînes assez longues, puisqu'ils donnent les réactions de polypeptides déjà compliquées que sont les peptones et les albumoses. Ces corps ayant une réaction de Millon positive, contiennent de la tyrosine, mais cette tyrosine n'est pas libre. Elle doit occuper, dans l'enchaînement moléculaire, une situation telle que la tyrosinase ne peut exercer sur elle aucune action et qu'il ne peut se former de mélanine.

Nous avons vu que BERTRAND (1908), pense que le jeu des réactions diastasiques de l'organisme tend à former la mélanine la plus simple. C'est ainsi que la réaction de la tyrosinase a pu être utilisée (CHODAT et STAUB, HARLAY), pour indiquer le degré de l'hydrolyse dans les produits de digestion, cette réaction n'apparaissant que lorsque la dislocation est avancée.

La meilleure preuve que dans le pigment amino-acide des Décapodes non mélaniques, la tyrosine est dans une situation où elle ne peut être mélanisée, c'est que si l'on hydrolyse avec un ferment (trypsine), l'extrait aqueux du pigment amino-acide, au bout de dix à douze heures, l'action de la tyrosinase, qui était nulle avant, se fera sentir et l'on obtiendra le noircissement connu. Les molécules ont été disloquées et la tyrosine est devenue oxydable.

Il résulte de ces faits, que chez les Crustacés non mélaniques le métabolisme de la désintégration des protéiques aboutit à l'élaboration, dans les amino-acidophores, de produits moins avancés.

Si cette désintégration est due, comme c'est probable, à un ferment hydrolysant, ce ferment doit être différent chez les Crustacés mélaniques et chez les non mélaniques,

si bien qu'il aboutit chez les premiers à l'apparition d'un chromogène dans le pigment amino-acide et qu'il n'y aboutit jamais chez les autres. Dans les deux cas, le pigment est soluble dans l'eau et a un aspect morphologique assez semblable. La forme de granulations régulièrement arrondies, qu'il revêt, est sans doute en rapport avec son élaboration mitochondriale et est rigoureusement déterminée par les lois physico-chimiques ; c'est le seul aspect que dans l'un et l'autre cas il puisse prendre.

Dans l'un, la tyrosine est oxydable, dans l'autre elle ne l'est pas. Aussi pour les distinguer, pourra-t-on les appeler : pigment amino-acide abiurétique à tyrosine mélanisable et pigment amino-acide biurétique à tyrosine non mélanisable.

CHAPITRE VI

Série de la Zooérythrine ou des composés carotinoïdes

Sommaire. — Définition : Zooérythrine et pigments dérivés. — Première partie : Zooérythrine. 1° Répartition ; 2° Histologie des chromatophores ; 3° Morphologie du produit pigmentaire ; 4° Nature du pigment. Historique. Méthodes. Propriétés physiques. Propriétés chimiques ; 5° Histochimie de la Zooérythrine.

Deuxième partie : Pigment dérivé de la Zooérythrine ou Carotinalbumine.

Plus encore que les pigments de la série précédente, ceux que je vais étudier dans ce chapitre peuvent paraître éloignés les uns des autres au premier abord. Si l'on s'en tenait aux caractères extérieurs, à la couleur, à l'état physique, il y aurait lieu d'être étonné de les trouver réunis. Ce n'est que l'étude de la composition de ces pigments, de leur évolution, de leur biologie, qui montre leur filiation. Beaucoup, parmi les auteurs qui les ont étudiés, ont soupçonné cette parenté, mais sans arriver à la démontrer de façon bien positive et surtout sans déter-

miner quel est le corps placé comme une clé de voûte des différents édifices pigmentaires de cette série.

Il ne s'agit en somme que des modifications d'un même pigment primitif, suivant les conditions chimiques du milieu. J'étudierai ce pigment rouge ou zooérythrine et dans une deuxième partie ses combinaisons protéiques. Ces différents pigments se rencontrent à la fois chez tous les Décapodes, où leur présence a depuis longtemps attiré l'attention, qu'il s'agisse des Macroures, des Anomoures ou des Brachyoures. Ce sont eux qui donnent aux téguments de ces Crustacés leur coloration générale, tout en comportant de larges variations quantitatives.

Première partie : Zooérythrine ou pigment rouge

Des noms divers ont été donnés à ce pigment par les auteurs qui l'ont étudié. C'est la tétronérytrine ou zoonérythrine de MEREJKOWSKI, la vitellerubine et vitello-lutéine de MALY, la crustacéorubine de MOSELEY et de NEWBIGIN. Ces noms ne représentent souvent qu'un des éléments du pigment. Le nom de lipochrome qui lui a aussi été donné (HEIM), n'est pas heureux, il établit, dans l'esprit, une association avec les corps gras, qui est fausse. Il est du reste ambigu, n'indiquant pas si le pigment est seulement soluble dans les graisses ou s'il fait lui-même partie chimiquement d'un corps gras. Malgré les résultats nouveaux que j'apporte dans mon travail, je conserverai un nom ancien, celui de zoonérythrine, qui me paraît convenir à merveille pour désigner le pigment rouge à l'état brut, dans son hétérogénéité probable et qui permettra de grouper tous les pigments animaux, ayant une constitution chimique analogue. Je me contenterai de modifier légèrement ce nom et de le présenter sous la forme : zooérythrine. Comme me l'a judicieusement fait remarquer M. le

Professeur Lapicque, le mot *zoonérythrine* résulte d'une formation vicieuse.

1° Répartition. — La *zooérythrine* se trouve à l'état non combiné à peu près uniquement dans les chromatophores. On en rencontre une petite quantité dans le sang des Décapodes, en solution dans des corps gras ou des lipoides.

Elle donne à ce liquide une teinte rosée qui peut masquer la teinte bleue due à l'hémocyanine, principalement lorsque ce dernier corps est peu abondant. Dans tous les autres tissus d'où l'on peut pourtant l'extraire — la carapace, les œufs par exemple — la *zooérythrine* est combinée.

Dans ces conditions elle change fréquemment de couleur et se trouve être, comme nous le verrons, d'un bleu plus ou moins pur, mais souvent aussi sa teinte reste rouge ou rouge brunâtre. Dans ces conditions même, comme l'a le premier bien vu HEIM, un tel pigment quoique dérivé de la *zooérythrine* et pouvant la régénérer facilement, a des propriétés bien différentes. Au point de vue biologique, l'étude de la *zooérythrine* revient donc à peu près à l'étude des chromatophores et de leur contenu.

Ces chromatophores se trouvent localisés dans l'hypoderme. Ils sont situés superficiellement en contact presque immédiat avec la carapace, dont l'épiderme seul les sépare souvent. Leur répartition, par rapport aux faces de l'animal, est intéressante à connaître au point de vue de la physiologie du pigment. Seules, les régions directement éclairées contiennent ces chromatophores. C'est un fait d'observation courante que l'hypoderme de

la face dorsale de la carapace présente seul ces éléments. Un fait pourrait sembler faire exception, c'est la présence de chromatophores à pigment rouge sur la face dorsale de l'abdomen des Paguridés, alors que cet abdomen est à l'abri dans une coquille. Une très ingénieuse expérience faite par MERCIER (1), montre qu'à travers la paroi de la coquille, la lumière fait sentir son action chimique aux profondeurs où vivent ces animaux. La présence de ce pigment rentre ainsi dans la règle générale. Au contraire la face inférieure de l'abdomen, qui repose sur l'enroulement de la coquille, ne présente jamais de zooérythrine.

2° Histologie des chromatophores. — En raison de leur contenu, j'appellerai ces éléments érythrophores. Ce nom est déjà utilisé dans l'histologie du pigment dans un sens assez large. Je tiens à le préciser en le réservant aux cellules pigmentaires qui contiennent de la zooérythrine, cette dernière étant chimiquement définie comme elle va l'être au cours de ce chapitre.

Etant donnés les caractères de solubilité facile du pigment rouge dans les réactifs usuels de l'histologie, la méthode de choix, pour son étude et celle des érythrophores par conséquent, est l'examen à l'état frais, par simple étalement. Quand l'hypoderme atteint une certaine épaisseur, on peut pratiquer avec succès des coupes par congélation.

Comme je le montrerai, les fixations prolongées par l'acide chromique ou les bichromates oxydent le pigment

(1) Je remercie M. le Professeur Mercier de m'avoir autorisé à faire part de cette expérience non encore publiée.

rouge et son substratum dans une première phase, l'insolubilisent ensuite. Dans ces conditions, avec une durée de fixation convenable et du reste variable suivant différents facteurs (température, concentration des solutions), on peut réaliser secondairement des colorations comme la laque ferrique d'hématoxyline.

Mais ces procédés doivent rester tout à fait accessoires. Ils n'ont aucune spécificité et exigent par conséquent un repérage précis par l'examen à l'état frais.

Les érythrophores se présentent généralement comme des éléments ramifiés mais dont les branches ou chromorhizes ont un aspect trapu et jamais finement découpé comme ceux des mélanophores par exemple. Ce fait tient vraisemblablement à l'état physique de la zooérythrine et aux phénomènes de tension superficielle qui résultent de sa présence à l'intérieur du corps cellulaire.

Leurs dimensions varient de 100 à 200 μ . Ils sont susceptibles de mouvements d'expansion et de rétraction, comme les mélanophores.

La substance pigmentaire remplit généralement complètement le corps cellulaire. Le noyau peut être vu par transparence, se détachant en plus clair sur le fond coloré de la cellule (fig. 8, Pl. II). Il est unique et arrondi, généralement situé vers le centre du chromatophore. Je n'ai jamais observé qu'il existât des mouvements importants de la substance pigmentaire indépendants des mouvements propres de la cellule. Les détails cytologiques ne peuvent être étudiés que sur des chromatophores jeunes, dont le cytoplasma n'est pas encore complètement envahi par le pigment, ou sur des préparations d'où le pigment a été enlevé par un solvant. Les chromatophores jeunes sont des objets favorables à l'étude de

la formation du pigment. Par les techniques en usage (REGAUD, BENDA), on peut mettre en évidence des mitochondries qui vont en diminuant d'importance à mesure que le chromatophore vieillit. Je reviendrai sur ces organites en étudiant au paragraphe suivant l'origine cytologique du pigment. Il me reste à signaler que les érythrophores entrent souvent en contact les uns avec les autres, formant ainsi des complexes où il est difficile de reconnaître les cellules constitutantes. Ce contact intime peut aussi avoir lieu avec des chromatophores de la série azotée et en imposer pour des éléments contenant à la fois des pigments de séries différentes, ce que je n'ai jamais vérifié.

3° Morphologie du produit pigmentaire. — La zooérythrine se présente à l'intérieur des chromatophores sous des aspects différents, tantôt à l'état grossièrement granuleux, tantôt à l'état de boules ou de flaques d'une seule venue. Le pigment dissous par certains réactifs comme l'acétone, laisse voir un substratum sur lequel je reviendrai au paragraphe de l'histochimie.

Si l'on examine avec soin un embryon ou l'hypoderme d'un animal adulte, on rencontre, presque à coup sûr, des chromatophores de taille plus petite, contenant peu de pigment et présentant toujours ce pigment sous forme de grains et même de granules, dont quelques-uns sont très fins, ne dépassant pas comme dimensions un demi-micron. Plus loin, on voit ces grains entrer en coalescence et conduire aux boules et aux flaques décrites ci-dessus. (pl. II. fig. 6 et 8).

Cette observation est particulièrement facile à réaliser si l'on traite au préalable l'hypoderme sur la préparation

par une goutte de solution aqueuse, très diluée, d'iode dans l'iodure de potassium. Dans ces conditions, nous verrons pourquoi, lors de l'étude chimique du pigment, ce dernier se colore en un brun violet, noir par lumière transmise et les grains les plus petits deviennent facilement visibles (pl. II. fig. 7)

Or on constate, qu'à côté des grains les plus fins ainsi colorés, il en existe d'autres non colorés, également très fins, et qui ne sont visibles sur les préparations ainsi faites à l'état frais que grâce à leur réfringence. Suivant les cellules examinées, il y a un balancement entre la quantité de grains de pigment décelables par l'iode et la quantité de grains réfringents, qui ne sont autres que des mitochondries. Une fois que l'on a bien localisé les érythrophores dans l'hypoderme, par des dissociations et des examens à l'état frais on peut contrôler la nature mitochondriale de ces grains et leur disposition, en utilisant les méthodes classiques de REGAUD ou de BENDA.

Dans ces conditions aussi bien qu'à l'état frais, j'ai vérifié constamment la présence de mitochondries granuleuses, mais n'ai pu observer de chondriocontes. Ces mitochondries forment des amas périnucléaires. On les voit se gonfler et comme se vacuoliser à mesure qu'elles deviennent grains de pigment, puis elles disparaissent quand le cytoplasma est envahi par la vaste enclave que représente la flaque de pigment.

Cette formation cytologique du pigment rouge, aux dépens de mitochondries, est à rapprocher de celle des granules de pigment amino-acide. Toutefois dans le cas de la zooérythrine, je n'ai pas observé, entre la mitochondrie et le plaste de pigment élaboré, de phase où la granulation soit colorable vitalement. Cela tient évidem-

ment à la différence du chimisme. Dans l'un et l'autre cas, le phénomène cytologique, dont il s'agit, n'est autre qu'un véritable phénomène de sécrétion, analogue à celui que l'on peut constater dans les cellules glandulaires. La seule différence est que, dans ces dernières, le produit élaboré est rejeté hors de la cellule, tandis que, dans le cas de la cellule pigmentaire, il séjourne et s'accumule. La cellule glandulaire peut recommencer à sécréter, la cellule pigmentaire encombrée est devenue inactive, elle est cytologiquement morte.

Il est intéressant de rapprocher cette origine mitochondriale des pigments des Crustacés et de la zooérythrine en particulier, de l'origine de pigments, que la chimie nous montrera être extrêmement voisins de cette dernière, je veux parler du carotène et de la xanthophylle des végétaux. On sait, depuis les belles recherches de GUILLERMOND, que les pigments chez les végétaux résultent de l'activité des mitochondries, pouvant, d'après cet auteur, s'effectuer selon les cas par des procédés divers. Le pigment peut être élaboré directement dans des mitochondries ou par l'intermédiaire de plastes. Il apparaît à l'état de granulations ou de cristaux.

Le type, que j'observe chez les Décapodes, est celui de l'élaboration directe par des mitochondries, mais sans qu'il y ait jamais formation de cristaux. Enfin, alors que GUILLERMOND observe dans la plupart des cas des chondriocones, j'ai à faire dans les érythrophores à des mitochondries du type granuleux.

La couleur rouge de la zooérythrine présente différentes tonalités suivant les espèces examinées. Elle varie du rouge orangé (*Cancer*) au rouge écarlate (*Homarus*).

Je tiens à signaler ici un phénomène dont nous verrons

l'explication au paragraphe histochimique et qui a été déjà signalé (MEGUSAR). L'extrémité des chromorhizes, chez *Palæmon* par exemple, n'a plus la couleur rouge que le pigment a dans le reste du chromatophore. La teinte passe à un jaune plus ou moins clair, parfois presque incolore (Pl. II, fig. 8).

4° Nature du pigment. — Les caractères de solubilité du pigment rouge des Crustacés ont été notés par les premiers observateurs qui aient étudié ce corps. De bonne heure aussi, on a reconnu qu'il donnait les réactions des substances désignées dans le règne animal sous le nom très général de lipochrome par KRÜKENBERG ou de lutéine par THUDICHUM et notamment une coloration bleue par l'acide sulfurique ou l'acide azotique. Cependant, la plupart des chercheurs se sont surtout préoccupés d'étudier les bandes d'absorption données par ce pigment à l'examen spectroscopique. On trouvera dans les travaux de NEWBIGIN (1897) et de VEGEZZI (1916) un historique détaillé de la question, à ce point de vue spécial. Je n'envisagerai ici que les travaux, où la nature chimique du pigment a cherché à être déterminée.

POUCHET (1876) a tenté d'isoler le pigment rouge des Crustacés. Il traitait l'hypoderme du homard, à chaud, par un mélange d'alcool et d'éther et il voyait, au bout de quelques jours, se précipiter des cristaux rouges, qu'il décrit longuement et qui paraissaient stables. Il ne dit, du reste, pas grand chose sur les réactions de ces cristaux. J'ai essayé, en opérant dans les mêmes conditions et je n'ai pu obtenir aucun résultat. De toute façon il ne semble pas que l'on ait à faire là au principe même du pigment, qui est éminemment altérable, et qui serait détruit dans les conditions où l'auteur opérait.

MALY (1881), par la méthode spectroscopique, isole, des œufs de *Maia squinado*, un pigment rouge et jaune qu'il qualifie respectivement de vitellorubine et de vitellolutéine.

KRÜKENBERG, en 1882, dénomma lipochrome le pigment

rouge des Crustacés, en raison de réactions chimiques, comme la coloration bleue par l'acide sulfurique, qui le rapprochaient du lipochrome des autres animaux.

Jusqu'ici, aucun auteur n'a apporté de résultats bien nets sur la composition du pigment, ou au moins sur son rapprochement possible avec d'autres substances, présentes chez les êtres vivants et dont la composition soit connue. BLANCHARD (1889) et surtout ZOPF (1893), chez le même copépode *Diaptomus*, isolèrent, en solution, des pigments qu'ils rapprochèrent de la carotine des végétaux. BLANCHARD se base surtout sur une impression pour faire ce rapprochement, mais ZOPF a étudié avec soin les bandes d'absorption, ainsi que la composition élémentaire des constituants du pigment. Il isole ainsi une carotine jaune à laquelle il assigne comme constitution C₂₆H₃₈ et une carotine rouge qui, d'après lui, devait contenir de l'oxygène. ZOPF pense que les pigments des Crustacés supérieurs sont identiques à ceux de ce Copépode.

HEIM (1892) n'a pas apporté beaucoup de lumière sur la question. Il critique l'appellation de carotine, proposée par BLANCHARD, et préfère les noms de lutéine ou de lipochrome, qui selon lui constituent une classe chimique mieux définie. Son œuvre fourmille, d'ailleurs, d'erreurs d'interprétation. Il signale cependant qu'une parenté unit, peut-être, le pigment rouge et les cholestérines.

NEUBIGIN (1897) s'efforce de trouver une méthode d'extraction des pigments des Crustacés Décapodes et sépare un pigment rouge ou crustacéorubine, qui serait un lipochrome et un pigment jaune qu'elle appelle hépatochrome, en raison de son origine et qui donnerait naissance au rouge.

KEEBLE et GAMBLE (1904-1906), dans les travaux dont j'ai déjà parlé, font de nouveau le rapprochement du pigment rouge des Crustacés et de la carotine végétale, mais sans entrer dans aucune précision chimique et seulement à la suite d'un rapprochement physiologique.

KORNFELD (1912) a émis des idées tout à fait à part. Pour lui, le pigment rouge des Crustacés, de l'écrevisse en particulier, n'est autre chose que de l'alizarine. Je ne m'attarderai

pas sur cette assertion fantaisiste et dénuée de tout fondement, qui a du reste été réfutée de façon décisive par GRANDMOUGIN (1913) et VEGEZZI (1916).

Il me reste pour terminer cette revue à indiquer l'étude, si claire et documentée, faite par VEGEZZI, élève de DHÉRÉ, sur les pigments des Invertébrés et en particulier la tétronérythrine (1916). Je n'ai eu connaissance de ce travail que lorsque j'eus l'honneur de rencontrer M. DHÉRÉ, au congrès de Physiologie, à Paris, en 1920. L'auteur a étudié spécialement l'adsorption et le spectre des solutions de la tétronérythrine des Crustacés (*Maia squinado*). Il se trouve que par cette étude physique, méthode différente de celle suivie par moi, VEGEZZI arrive à des résultats voisins des miens. Ce sera un argument de plus en faveur des conclusions que j'apporterai et qui me seront fournies par l'investigation chimique : la présence de Carotène dans le pigment rouge des Crustacés.

Il ressort de cet exposé bibliographique et surtout des résultats de ZOPF et de VEGEZZI que le pigment rouge des Crustacés n'est pas homogène et ce fait explique que l'on n'ait pu arriver encore à des résultats concluants sur sa composition chimique. La plupart des auteurs opéraient sur des mélanges, d'où la diversité des conclusions suivant la méthode employée. Cette confusion est évidente dans l'étude des spectres d'absorption. Une, deux ou trois bandes d'absorption ont tour à tour été décrites et dans des positions différentes, suivant les corps présents dans le complexe en solution, et je crois que VEGEZZI seul a obtenu des résultats précis en utilisant sa méthode chromatographique.

Pigment brut ou amorphe. Caractères de solubilité.

Il est aisé, étant donnés ses caractères de solubilité, de se procurer une solution de zooérythrine, mais on n'obtient, dans ces conditions, qu'un mélange de pigments et de lipoïdes divers, qui, par évaporation, a un aspect gras ou même huileux. La zooérythrine fait partie des corps présents dans l'extract éthéré d'un organe. Telle qu'on la rencontre dans les chromatophores, elle est soluble dans l'alcool à 95° et

l'alcool absolu, dans le chloroforme, l'acétone, le toluol, le sulfure de carbone, l'éther de pétrole et autres solvants organiques neutres. Elle est soluble dans la créosote, les essences, les carbures liquides, les graisses, les lipoides et les acides gras. Elle est insoluble dans l'eau, la glycérine, le formol, les acides minéraux et les solutions alcalines.

L'étude des caractères de solubilité peut être intéressante à deux points de vue : 1° à un point de vue chimique, pour l'extraction et l'identification du pigment et de ses constituants, on aura recours aux divers solvants neutres ; 2° au point de vue de la physiologie, du métabolisme du pigment, la solubilité de la zooérythrine dans les corps gras et les lipoides, est d'une importance capitale.

Une question discutée est celle de la solubilité dans l'eau. Plusieurs auteurs ont admis que la zooérythrine serait soluble dans l'eau contenant des protéines. VEGEZZI notamment, pense que le pigment existerait dans ces conditions à l'état de solution colloïdale et il démontre que, dans une telle solution, il est indialysable. PALMER et ECKLES admettent qu'il s'agit là d'une combinaison protéique. Je me rallie à cette manière de voir. Le pigment extrait de l'hypoderme n'est en cet état soluble ni dans l'eau, ni dans aucun réactif aqueux. Lorsque l'on rencontre la zooérythrine dans l'eau, elle est, soit à l'état de combinaison protéique, soit dissoute dans les graisses en suspension dans ce liquide. SMITH et ROBSON (1912) soutiennent aussi cette dernière opinion pour le pigment que l'on rencontre dans le sang des Crustacés.

Si l'on s'en tient à la large définition des lipoides, qui repose avant tout sur des caractères physiques, de solubilité principalement, la zooérythrine peut rentrer dans cette vaste catégorie. Mais l'esprit ne sera pas satisfait d'un jugement si rapide. Il ne faut pas s'en tenir là et déclarer la tâche terminée pour avoir précipité une substance de plus dans ce "fourre-tout" biologique. Dans un travail tout récent, LINOSSIER (1920) a du reste beaucoup restreint et avec juste raison la signification du terme lipoïde. Pour lui, aux caractères physiques cités, les corps, faisant partie de cette classe, doivent joindre une composition chimique définie par

la présence d'acides gras ou de cholestérines dans leur molécule.

C'est en présence du produit complexe qu'est la zooérythrine, que se trouvera le biologiste, qui étudiera l'animal vivant et c'est sur elle que devront porter alors son observation ou son expérimentation. Mais, sous peine d'opérer empiriquement et de méconnaître le métabolisme cellulaire, il devra, dans une investigation spéciale, isoler les éléments du complexe et déterminer quel est celui de ces éléments qui, en raison de ses propriétés physiques et chimiques caractéristiques, donne au pigment ses traits fondamentaux, réactions histochimiques et action physiologique entre autres. Suivant l'identification à laquelle on veut procéder, les méthodes de séparation pourront du reste varier. Si l'on veut s'en tenir à une différenciation par les caractères physiques ou physico-chimiques, on pourra se contenter de procédés plus simples, n'ayant pas nécessité d'écarter des corps, dont la présence ne gêne pas l'étude de ces caractères. Infiniment plus complexe sera la séparation chimique qui doit arriver à l'obtention de corps purs, cristallisés la plupart du temps. Cette opération sera longue et se heurtera à des difficultés, résultant de la nature même des éléments à isoler, mais elle sera, je le répète, indispensable. Ces quelques considérations sont la justification de la marche que j'ai suivie. J'exposerai d'abord comment je suis arrivé à identifier les éléments du pigment rouge, ayant recours aux méthodes de la chimie organique. La nature du pigment une fois connue, je pourrai montrer comment procéder, par des réactions

qui ne seront plus désormais empiriques, à leur identification histochimique.

**Méthodes chimiques
pour la recherche de la composition
de la Zooérythrine**

Je vais donner une idée générale des méthodes utilisées par d'autres chercheurs, avant d'exposer celles que j'ai moi-même mises en œuvre.

MALY (1881) a opéré sur les œufs de *Maia*, d'où il isolait une vitello-rubine et une vitello-lutéine. Il a employé trois méthodes :

1° Il traitait les œufs par une solution aqueuse froide d'albumine. Il coagulait la solution de pigment obtenue, par l'ébullition après addition d'acide acétique et il épuisait le coagulum, d'abord par l'éther de pétrole, puis par le sulfure de carbone. Le premier solvant devient jaune, le deuxième rouge foncé ;

2° Il traitait un extrait alcoolique des œufs par du noir animal. La solution filtrait jaune, le pigment rouge étant d'après MALY retenu sur le filtre ;

3° Il ajoutait, à l'extrait alcoolique, de l'eau de baryte saturée chaude. Le pigment rouge était complètement précipité comme un composé de baryte, mais pas le jaune. Le précipité était lavé à l'alcool, puis repris par l'alcool acide, au moyen duquel on l'obtient pur.

KRÜKENBERG (1882) a répété les observations de MALY, sur *Maia*. Il employait une méthode un peu différente. Il faisait un extrait alcoolique et le saponifiait, en ajoutant de la lessive de soude à 20 %, dans la proportion de 1 pour 50. Il chassait l'alcool par la chaleur, ajoutait de l'eau et après un moment d'ébullition, une forte solution de chlorure de sodium. Le savon était extrait par de l'éther de pétrole à plusieurs reprises, puis par de l'éther ordinaire. D'après KRÜKENBERG, la première solution contenait la vitellolutéine

de MALY, donnant un spectre à deux bandes. La deuxième contenait la vitellorubine, donnant un spectre à une bande. KRÜKENBERG croyait que la zooérythrine contenait encore un pigment différent ne donnant pas de bande d'absorption.

ZOPF (1893) épuisait les œufs par un mélange d'alcool chaud et d'éther. Il chassait l'éther par évaporation, ajoutait de la soude, faisait bouillir pour chasser l'alcool et ajoutait un excès de sel. Le savon était traité par l'éther de pétrole qui devenait jaune et donnait un spectre à deux bandes; par évaporation, on obtenait un pigment jaune, donnant une couleur bleue avec les acides. Le savon était ensuite lavé à l'éther, puis à l'acide sulfurique dilué, puis de nouveau à l'éther qui devenait jaune-rouge, donnant un spectre à une seule bande d'absorption. Par évaporation, il restait un pigment rouge donnant aussi la réaction bleue avec les acides.

NEUBIGIN emploie (1897) une méthode plus simple. Elle prépare à chaud un extrait alcoolique avec la carapace, après décalcification par un acide. Elle ajoute à cet extrait alcoolique, de la lessive de soude. Le tout est chauffé au bain-marie en ajoutant de l'eau. En quelques minutes, on obtient un précipité de pigment jaune-orangé, dû pour l'auteur à une combinaison sodique du pigment. La solution demeure jaune, n'est précipitable par aucun réactif et ne donne pas les réactions des lipochromes.

J'ai essayé toutes ces méthodes. Aucune ne m'a donné pleine satisfaction. Le produit obtenu est toujours hétérogène. Jamais aucun corps cristallisé n'y apparaît. Elles sont mauvaises, d'abord parce qu'ayant pour point de départ l'organe le plus riche en graisses ou en lipoides (œufs), elles ne permettent pas une bonne séparation de ces produits, et aussi parce qu'elles reposent sur des principes faux. La séparation d'éléments différents, en se basant sur la couleur des solutions, est tout à fait artificielle, si l'on songe combien varie la couleur d'un corps défini comme le carotène, d'un solvant à l'autre. La précipitation du pigment, par addition de lessive de soude ou de solution de baryte, n'est pas due à la formation d'un composé avec la soude ou la baryte, mais

simplement à l'abaissement du titre de la solution alcoolique où le pigment cesse d'être soluble. La soude ou la baryte, ajoutées en solution alcoolique, ne déterminent jamais de précipité. Ces méthodes ne tiennent aucun compte de l'altérabilité si grande de la zooérythrine, principalement de son oxydabilité. C'est pour n'avoir pas tenu compte de ces faits que des auteurs ont pu trouver de l'azote dans les lipochromes d'animaux appartenant à d'autres groupes (GRIFFITHS, 1900).

VEGEZZI, pour la préparation des solutions qui ont servi à ses recherches, se préoccupe des écueils que je viens de signaler. Il part aussi d'œufs de *Maia*, mais desséchés dans le vide et à l'obscurité. Ces œufs sont pulvérisés et broyés avec de l'eau distillée. Après agitation on décante et l'on obtient une liqueur colorée en rouge et limpide. On peut encore extraire de la couleur des résidus. Les liqueurs, chargées de pigment, sont additionnées d'alcool à 96° à volume égal. Il se produit un précipité qui entraîne le pigment. Après dessiccation, le précipité protéique rouge vif est repris par un mélange d'éther, de pétrole et d'acétone. La liqueur est lavée, déshydratée et concentrée par évaporation.

L'auteur pense que, dans ces conditions, en n'utilisant à froid que de l'eau et de l'alcool, on évite toute altération des pigments et que par les manipulations indiquées, les graisses et les lipoides ne peuvent être extraits. Cette méthode est basée sur le fait que le pigment contenu dans les œufs est soluble dans l'eau. Pour VEGEZZI, il s'agit de solution colloïdale de tétronérythrine, qui passe en solution aqueuse à la faveur de la présence de protéines. A mon avis, il s'agit, comme j'y reviendrai tout à l'heure, d'une combinaison protéique, soluble dans l'eau, décomposée ensuite par l'alcool et dont la zooérythrine serait le groupement prosthétique. Dans ces conditions, tous les lipoides contenus si abondamment dans les œufs sont-ils vraiment écartés ? Ne peut-il en rester, fixés sur les protéiques à l'état notamment de composés lipoprotéiques ? Toujours est-il que cette méthode également essayée par moi sur le même objet, ne

m'a point permis non plus d'arriver directement à des corps purs au point de vue chimique. Cela ne lui enlève rien de sa valeur et pour les recherches spéciales de spectroscopie et d'adsorption auxquelles se livrait VEGEZZI elle n'a aucune raison de ne pas être excellente.

Frappé par les analogies de la zooérythrine des Crustacés avec les pigments végétaux, j'eus l'idée d'avoir recours aux principes des méthodes, utilisées en botanique pour isoler ces pigments et du reste déjà adoptées par ESCHER (1913), dans son travail sur le pigment du corps jaune. Je n'indiquerai que les techniques que j'ai mises à contribution renvoyant, pour plus de détails aux mémoires des auteurs que je citerai.

J'ai signalé tout à l'heure les écueils à éviter. J'ai reconnu que pour prévenir l'altération si facile du pigment, il y avait intérêt à réduire au minimum les manipulations chimiques. Or le but de ces manipulations est de se débarrasser des corps gras et lipoides extraits avec le pigment. Il faudra donc extraire le pigment des régions les moins riches en ces corps. L'objet de choix me paraît être la carapace avec l'hypoderme qui la double. Le pigment dans la carapace étant en combinaison protéique, tantôt bleue, tantôt rouge, il convient de le libérer. Cette libération peut être obtenue de deux façons :

1° En traitant par une solution d'acide chlorhydrique diluée la carapace qui sera du même coup décalcifiée. On lavera soigneusement à l'eau distillée ;

2° En traitant la carapace par l'eau bouillante. Dans ce dernier cas on opère avec de l'eau distillée privée

d'air par ébullition, et la carapace y reste quelques minutes.

Après l'une de ces deux opérations, le pigment de la carapace se trouve soluble, comme celui de l'hypoderme, dans les solvants indiqués plus haut. Il faut au préalable bien sécher carapace et hypoderme, dans une cloche à vide au dessus de chlorure de calcium et à l'obscurité.

Les objets dont on veut extraire la zooérythrine sont, après ce traitement, repris plusieurs fois par l'éther de pétrole dans un flacon bien bouché et à l'obscurité. On peut employer aussi le sulfure de carbone, où le pigment est peut-être encore plus soluble, mais il faut avoir soin de redistiller ce solvant, car le produit commercial contient fréquemment du soufre.

La première opération de purification sera de séparer, de la solution dans l'éther de pétrole ou le sulfure de carbone, les corps plus solubles dans l'alcool (produits oxydés). Cette opération est pratiquée de longue date en technique botanique sous le nom d'*Entmischung* (STOKES d'après ESCHER, WILLSTATER et MIEG, TSWETT). PALMER et ECKLES l'ont utilisée comme moyen de caractérisation du carotène chez les Mammifères. Je me sers d'alcool éthylique à 90°. Après agitation dans une boule à décantation, on voit se former deux couches : une couche supérieure jaune-orangé représentant l'éther de pétrole, une couche inférieure alcoolique plus ou moins colorée en jaune. Dans le cas du sulfure de carbone comme solvant, ce dernier représente la couche inférieure en raison de sa densité et il est coloré en rouge vif.

L'extrait, qui dès maintenant est formé à peu près exclusivement comme pigment du corps que je caracté-

riserai comme un carotène, doit subir les opérations destinées à le séparer des corps gras et lipoïdes ayant les mêmes caractères de solubilité que lui et dont la présence, même en très faible quantité, empêcherait sa cristallisation. J'ai utilisé dans ce but l'une des deux méthodes suivantes, qui toutes deux m'ont donné de bons résultats.

L'une est l'adaptation de celle qu'EULER et NORDENSON (1908) ont employée pour extraire le carotène des carottes. La solution de pigment dans l'éther de pétrole, recueillie par décantation, est additionnée de potasse en solution alcoolique à volumes égaux et chauffée avec précaution au bain-marie. Au bout de dix minutes de douce ébullition, on ajoute de l'éther et on a un léger précipité contenant des sels d'acides gras. La solution éthérée est neutralisée par de l'acide sulfurique, puis agitée avec beaucoup d'eau pour laver l'éther. On décante la couche éthérée et la dessèche plusieurs jours sur du sulfate de sodium anhydre. On décante le liquide et lave le sulfate de sodium avec de l'éther pur. Par concentration, on a cristallisation.

L'autre technique est inspirée d'ESCHER (1913). La solution de pigment dans l'éther de pétrole, est soigneusement débarrassée d'alcool par addition d'eau distillée, puis desséchée sur du sulfate de sodium anhydre. On évapore dans le vide. Il reste un produit plus ou moins sirupeux auquel on ajoute 6 à 10 fois son volume d'alcool éthylique absolu. On congèle pour précipiter les matières grasses. On filtre et remet le filtrat dans la glacière. Par concentration, des cristaux apparaissent.

Le rendement fourni par cette deuxième méthode est peut-être supérieur, mais la première permet une meil-

leure séparation des corps gras, aussi a-t-on intérêt à l'employer quand les tissus sont riches en graisses.

Les cristaux une fois obtenus peuvent être encore purifiés par lavage en différents solvants comme l'indiquait ARNAUD (1885).

Il faut bien se rappeler que toutes les opérations décrites ci-dessus demandent à être accomplies avec soin et minutie, sous peine de ne pas arriver à des résultats satisfaisants. Il faut tenir compte du fait que le pigment est extrêmement oxydable, dès la température ordinaire et surtout à la lumière, et cette oxydabilité devient d'autant plus grande que le pigment est plus pur. On est tenu dans un dilemme qui est, ou bien de n'avoir pas un corps suffisamment pur, ou bien de risquer de le détruire par des traitements non appropriés. C'est là ce qui rend ces recherches si décevantes et difficiles. Le rendement est toujours assez faible. C'est chez *Homarus* que j'ai obtenu les meilleurs résultats. Un individu de taille moyenne peut fournir 15 à 20 milligrammes de cristaux, que l'on peut considérer comme purs.

Le produit cristallisé, auquel on aboutit par les techniques que je viens d'indiquer, représente la partie principale du pigment. Je vais maintenant l'étudier au point de vue de sa composition, de ses propriétés physiques et chimiques. J'envisagerai ensuite la question de l'hétérogénéité du pigment.

Analyse élémentaire. — J'ai procédé à cette analyse sur divers échantillons. Il est inutile de dire que là, plus que jamais, il faut redoubler de soins pour éviter l'oxydation. La combustion sur la grille d'analyse doit être faite immédiatement après l'obtention des cristaux purs.

J'ai utilisé un tube ouvert. La combustion avait lieu dans un courant d'oxygène. L'eau formée était recueillie dans une boule et un tube à chlorure de calcium, l'anhydride carbonique dans un tube de LIEBIG à lessive de potasse.

A) *Homarus vulgaris*.

1° Poids du produit soumis à l'analyse : 0 gr., 1015.

Poids d'H²O formée = 0, 0975

Poids de CO² — = 0, 325 d'où l'on tire

H = 0 gr., 01084

C = 0 gr., 08864

0 gr., 09948

2° Poids du produit soumis à l'analyse : 0 gr. 0685.

Poids d'H²O formée = 0, 062

Poids de CO² — = 0, 222 d'où l'on tire

H = 0 gr., 0068

C = 0 gr., 0605

0 gr., 0673

Le rapport de C à H est constant et est très voisin de celui trouvé pour le carotène végétal, dont la formule a été établie C₄₀H₅₆, soit C₅H₇.

	Calculé pour C ₅ H ₇ rapporté à 100	Résultat de la première analyse	Résultat de la deuxième analyse
C.....	89,552	89,174	89,895
H.....	10,447	10,965	10,222
Total.....	99,999	100,070	100,117

B) *Palinurus vulgaris*.

Poids du produit soumis à l'analyse = 0 gr., 063.

Poids d'H²O formée = 0, 0615

Poids de CO² — = 0, 201 d'où l'on tire
soit rapportés à C₅H₇

H = 0 gr., 0068 C=88,888

C = 0 gr., 0548 H=11,111

0 gr., 0616 99,999

Sur d'autres Crustacés, je n'ai pas obtenu suffisamment de produit cristallisé pour faire des analyses élémentaires, mais l'étude des propriétés physiques et chimiques m'a conduit à des conclusions identiques.

Il était intéressant de se rendre compte de la grandeur du poids moléculaire. La cryoscopie était difficile à cause des solvants ; j'ai eu recours à l'ébullioscopie.

J'ai pratiqué deux épreuves : l'une avec l'éther comme solvant, l'autre avec l'acétone. J'ai choisi ces solvants pour des raisons de commodité. J'ai appliqué la formule de RAOULT :

$$M = B \times \frac{P}{\Delta T}$$

B est une constante égale à 21 pour l'éther, à 16,8 pour l'acétone. P représente le poids du corps dissous dans 100 du solvant. ΔT est l'élévation du point d'ébullition.

1° Ether. Point d'ébullition de l'éther employé : 35° 34.

Point d'ébullition de la solution du carotène de Crustacés : 35° 40.

$\Delta T = 0^{\circ} 06$. P = 1 gr., 50. M = 525.

2° Acétone. Point de l'ébullition de l'acétone employée : 58° 50.

Point d'ébullition de la solution de carotène de Crustacé : 58° 61.

$\Delta T = 0^{\circ} 11$. $P = 3$ gr., 60. $M = 550$.

L'ordre de grandeur est bien celui correspondant au chiffre théorique (C_5H_7) $8 = C_{40}H_{56}$. Poids moléculaire = 536, qui est celui du carotène végétal.

J'ai cherché, d'un autre côté, à vérifier ce poids moléculaire par des méthodes chimiques. Un composé d'addition avec l'iode, se forme facilement. C'est la réaction que j'ai mise à profit.

A un poids connu de carotène de crustacés, on ajoute de l'iode et l'on détermine le poids de métalioïde qui se fixe ainsi. J'ai obtenu ce résultat par deux procédés qui se complètent :

1° Sur du carotène cristallisé, je verse une solution iodo-iodurée. Après un contact de 15 à 20 minutes, j'enlève le liquide et lave successivement avec une solution aqueuse d'iodure alcalin, puis avec de l'eau distillée. On dessèche à la température ordinaire, dans le vide, au dessus de chlorure de calcium. L'augmentation du poids, donne la quantité d'iode fixé. C'est ainsi que 0 gr. 0265 de carotène d'*Astacus*, représentent, après action de l'iode, un poids de 0 gr., 0390. C'est donc que 0 gr., 0125 d'iode se sont combinés. En ramenant les chiffres au poids atomique de l'iode, on en déduit que, à 269 parties en poids de carotène, se combinent 127 parties d'iode. Si l'on admet que l'on a à faire à un biiodure, on voit que deux atomes d'iode se combinent à une molécule de carotène, soit 538. L'approximation est très grande. Le biiodure répond à la formule $C_{40}H_{56}I_2$;

2° J'ai vérifié cette combinaison par la méthode

utilisée en chimie organique, pour la recherche de l'indice d'iode des graisses (d'après BERTRAND).

On pèse exactement une quantité donnée de carotène pur. On le dissout dans le chloroforme. On introduit une même quantité de chloroforme dans un flacon témoin. A chaque flacon on ajoute 20 c. c. exactement, mesurés d'une solution à 5 % d'iode dans l'alcool à 95° et 20 c. c. de solution de bichlorure de mercure à 6 % dans l'alcool à 95°. On bouche les flacons, on agite, et on laisse reposer 2 heures. On ajoute alors, dans chaque flacon 25 c. c. d'iodure de potassium à 20 %. On agite une à deux minutes, puis on titre l'excès d'iode par l'hyposulfite de soude N/5 jusqu'à décoloration. La différence $v-v'$ entre les volumes de solution d'hyposulfite nécessaire pour amener la décoloration dans chaque flacon, multiplié par 0 gr 0127 représente la quantité d'iode fixée.

Voici un exemple d'un de ces dosages pratiqués sur le carotène de *Homarus*. Poids de carotène = 0 gr., 090 ; $v-v' = 3$ c.c. 4, soit 0 gr., 04318 d'iode. D'où l'on tire que 254 d'iode se fixeront sur 530 de carotène. L'approximation est aussi grande que le comporte le dosage avec la liqueur titrée d'hyposulfite.

L'étude des propriétés physiques et chimiques va nous confirmer que le produit isolé de la zooérythrine fait partie de la famille des hydrocarbures, dits Carotènes.

Propriétés physiques.

Le corps que l'on obtient par les méthodes que j'ai indiquées se présente comme un amas cristallin d'aspect cireux. Les cristaux isolés sont des éléments microscop-

piques, généralement sous formes d'aiguilles, plus rarement sous forme de lamelles. La présence de petites quantités d'impuretés, surtout de corps gras, suffit à empêcher la cristallisation et le produit est alors amorphe.

Les cristaux présentent un dichroïsme typique. Ils sont mordorés par réflexion et rouges par transparence. Cette couleur varie du reste selon le Décapode d'où l'échantillon est extrait : elle est rouge foncé chez *Homarus* ou *Astacus*, rouge-orangé chez *Palinurus* ou *Cancer*.

Le point de fusion déterminé au bloc Maquenne varie de 169° à 172°. C'est le meilleur indice pour reconnaître la pureté d'un pigment examiné.

Le spectre d'absorption présente 2 bandes caractéristiques. VEGEZZI qui a fait une étude serrée de cette question, situe leur axe respectivement en 481,5 et 449,87 pour le pigment non adsorbable par la craie qu'il a extrait des œufs de *Maia*, examiné en solution dans l'éther sulfurique. J'ai vérifié que la situation des bandes n'était pas semblable suivant l'espèce qui avait fourni le pigment. J'ai retrouvé les bandes chez *Cancer* et *Palinurus* là où VEGEZZI les indique, mais chez *Homarus* ou *Astacus* elles m'ont paru déportées vers le rouge.

Ce fait, ainsi que la différence de couleur, me fait croire, chez les Décapodes, à l'existence de deux isomères du pigment, existant tantôt seuls, tantôt réunis, suivant les espèces (1). Cette question nécessiterait des recherches plus approfondies.

(1) On sait que chez les Végétaux il existe deux isomères qui sont la carotène et la lycopène (WILLSTATER et ESCHER, 1910 ; TOBLER, 1912).

Caractères de solubilité. — Ils sont essentiellement ceux que j'ai indiqués plus haut pour le pigment brut. Cependant la présence d'impuretés les modifiait légèrement. Ainsi le carotène isolé est à peine soluble dans l'alcool à 96°, très peu dans l'alcool absolu. Un fait remarquable est la différence de couleur des solutions suivant le solvant utilisé. Dans le sulfure de carbone on obtient une teinte rouge qui est considérée comme caractéristique, dans l'éther la couleur est jaune, jaune-orangé dans l'éther de pétrole. La puissance de coloration est considérable. Il suffit d'une trace pour donner une teinte au solvant.

Adsorption. — Les carotènes purs extraits de la zooérythrine, en solution dans l'éther de pétrole ne sont pas adsorbés par le carbonate de calcium pur et sec.

Propriétés chimiques. — Si les propriétés physiques ont montré quelques différences entre les corps extraits de la zooérythrine de différents Décapodes, les propriétés chimiques vont nous montrer que ce sont des composés identiques, au plus de simples isomères. L'analyse élémentaire l'avait, du reste, déjà prouvé.

Toutes les propriétés chimiques des carotènes en question dépendent du fait que ce sont des carbures non saturés, capables de fixer par addition des molécules d'autres corps. De là leur grande instabilité.

J'étudierai rapidement les combinaisons avec l'oxygène et, avec l'iode qui sont les plus caractéristiques, enfin, les réactions encore empiriques que donnent les carotènes des Crustacés avec l'acide sulfurique et l'acide azotique.

Combinaisons avec l'oxygène. — La facile oxydabilité de la zooérythrine a frappé tous les observateurs. C'est à la présence des carotènes que j'étudie actuellement, qu'elle est due. C'est du reste, un caractère commun à tous les carotènes. J'ai exposé dans une note (1920) la marche et les produits de cette oxydation. Cette étude se fait facilement à l'air et à la température ordinaire. « La fixation de l'oxygène est presque immédiate, mais elle est d'abord faible. Sur 100 parties en poids de carotène se fixent environ 3 à 3,5 parties d'oxygène. L'oxydation continue progressivement : elle atteint 6 à 7 % et marchè ensuite beaucoup plus lentement. Il faut des semaines pour arriver aux pourcentages de 20 à 30 % signalés par WILLSTÄTER pour le carotène végétal et d'après lui, très lents également à obtenir. A des températures plus élevées, l'oxydation se fait naturellement plus vite ». Tous les oxydants utilisés en chimie l'effectuent plus ou moins brutalement. Ainsi dans une solution d'acide chromique ou d'un bichromate alcalin, cette oxydation est immédiate. Je montrerai au paragraphe de l'histochimie quel peut être l'intérêt de cette action des sels chromiques.

Au cours de l'oxydation, le carotène se modifie complètement, tant au point de vue de ses propriétés physiques, que chimiques. Le produit n'a plus son aspect cristallin, les petits cristaux perdent vite leur forme. Ils se gonflent et font place à une gouttelette d'aspect amorphe. Le fait le plus typique est la disparition de la couleur, le blanchiment signalé par bien des auteurs. Le produit devient d'un rouge plus terne, puis jaunâtre et enfin incolore. Sa solubilité dans l'alcool devient facile; les autres solvants restent sensiblement les mêmes. Alors qu'il est

encore coloré, mais déjà riche en oxygène, le produit devient adsorbable par la craie dans les conditions où j'ai montré que le carotène pur ne l'est pas. Les bandes d'absorption du spectre disparaissent. Le point de fusion est plus bas que celui du carotène, mais il varie constamment avec les progrès de l'oxydation. Il n'y a plus formation de composé coloré en présence d'iode. L'acide sulfurique ne donne plus qu'une coloration rougeâtre suivie de brunissement.

Il semble qu'en s'oxydant, le carotène subisse une dislocation et qu'il se forme plusieurs corps nouveaux. En raison des réactions qui apparaissent (celles de SALKOWSKI, de LIEBERMANN, de SCHIFF) et en raison de la déviation à gauche de la lumière polarisée, j'admettais dans ma note qu'il se formait entre autres un corps voisin des cholestérines. Ce fait peut avoir de l'intérêt dans la question du métabolisme de la zooérythrine.

La formation de cholestérine aux dépens de carotène, a été soutenue par KOHL chez les végétaux (1902). Réfutée par TSWETT, elle est de nouveau admise par EWART (1915). Chez les animaux, HEIM avait pressenti un lien entre la cholestérine et le pigment qu'il appelait lutéine. En 1913, chez les insectes, SCHULZE a repris l'idée d'une cholestérine pouvant dériver du carotène.

Combinaison avec le soufre. — Je tiens à citer un corps que j'ai obtenu fortuitement, en dissolvant du carotène dans un sulfure de carbone contenant du soufre. J'ai obtenu par évaporation, au bout d'un contact assez prolongé, un composé d'une teinte rougeâtre, en cristaux dégageant du soufre, et charbonnant en même temps par chauffage et que je considère comme une

combinaison de carotène et de soufre. Il n'offre du reste d'autre intérêt que de montrer un exemple de plus d'une combinaison de carotène, voisine des combinaisons oxygénées et très stable.

Combinaison iodée. — Elle répond à la formule $C_{40}H_{56}I_2$. J'en ai déjà parlé, puisqu'elle m'a permis de contrôler le poids moléculaire du carotène de la zooérythrine. Elle constitue une réaction caractéristique ; le produit formé est de couleur brun violet. On peut l'obtenir sur le produit cristallisé qu'on arrose d'une solution iodo-iodurée. En ajoutant à une solution de carotène dans l'éther de pétrole des cristaux d'iode en nature ou en solution dans le même solvant, on obtient la précipitation de l'iodure de carotène sous forme cristalline. Si l'on met un excès d'iode en nature, on obtient des corps amorphes, sans doute plus riches en iode et de couleur vert brun.

Réactions avec les acides sulfurique et azotique. — Si l'on verse une goutte d'acide sulfurique concentré sur des cristaux de carotène, on assiste aussitôt à leur dissolution avec apparition d'une teinte bleue indigo, du reste assez fugace. Si dans un tube à essai, contenant quelques centimètres cubes de solution chloroformique de carotène, on verse un peu d'acide sulfurique concentré, on obtient à la limite de séparation des deux liquides un anneau bleu, et par agitation, le chloroforme se colore en bleu puis se décolore ultérieurement. Avec l'acide azotique, la teinte dans les deux cas tire sur le vert.

Ces deux réactions ont été indiquées anciennement et étaient considérées comme caractéristiques des corps

aits lipochromes. Elles le sont en réalité du carotène et des corps voisins (xanthophylles) et les lipochromes ne les doivent qu'à la présence de tels corps dans leur constitution.

Hétérogénéité de la Zooérythrine. — Il convient maintenant de se demander si la Zooérythrine est homogène, si elle est uniquement composée du carotène que j'ai pu extraire sous forme cristalline.

La réponse à mon avis doit être négative. Un certain nombre d'auteurs ont déjà décrit plusieurs pigments. ZOPF surtout, quoique chez les Copépodes, a bien mis cette pluralité en évidence. Les résultats des autres travaux anciens sont moins précis, nous l'avons vu. ROBSON (1912) décrit un lipochrome rose et un jaune dans le sang d'*Inachus Scorpio*. Mais c'est VEGEZZI qui, par sa méthode chromatographique, démontre de façon définitive cette inhomogénéité de la Zooérythrine. Cette méthode consiste essentiellement à faire traverser une colonne de craie à une solution de pigment dans l'éther de pétrole. Au cours de cette traversée, certains corps passent, d'autres sont adsorbés. Or, il passe un pigment qui, par son spectre, correspond au carotène et il y a au moins deux pigments adsorbés. L'un surtout est important et marque dans la craie une zone rouge brique large. Il possède un spectre différent du carotène.

De mon côté, j'ai constaté au cours de l'opération, dite de l'*Entmischung*, qui consiste à agiter la solution dans l'éther de pétrole avec de l'alcool, que l'alcool se colorait plus ou moins fortement en rose, suivant les espèces et les individus. Il doit s'agir là du pigment rouge adsorbable. Je n'ai malheureusement jamais pu

obtenir ce corps à l'état cristallisé. Une analyse élémentaire du produit amorphe, obtenu chez *Cancer pagurus*, m'a donné, après purification :

Poids du produit soumis à l'analyse = 0 gr., 110

Poids d'H²O formée = 0, 099

Poids de CO² — = 0, 322 d'où l'on tire

H = 0 gr., 010

C = 0 gr., 089

0 gr., 099 La différence,

attribuable à l'oxygène, est égale à 0 gr., 011.

Le rapport du carbone à l'hydrogène reste le même que dans le carotène C₅H₇. Il y a seulement de l'oxygène en plus.

Aussi peut-on se demander si l'on ne se trouve pas simplement en présence de produits à un degré plus ou moins avancé d'oxydation dérivant des carotènes. Les produits d'oxydation ont, nous l'avons vu, des propriétés chimiques et physiques différentes du carotène, notamment au point de vue de l'adsorption et de la solubilité et avant d'être incolores ils passent par un état où ils paraissent d'un rouge terne.

Etant donné la facile oxydabilité du carotène, il est certain que des produits d'oxydation se trouvent sans cesse mélangés à lui. Mais n'y a-t-il pas aussi, auprès de lui, des corps analogues à ceux rencontrés chez les végétaux et connus sous le nom de Xanthophylles. On sait que TSWETT a découvert dans le fruit de certains conifères un pigment rouge, la Rhodoxanthine, qui est un isomère des Xanthophylles. Il peut s'agir chez les Crustacés d'un corps analogue, mais présent en quantités extrêmement

faibles. Les résultats de VEGEZZI sont en faveur de cette manière de voir.

De toute façon, il ne peut s'agir, étant donné les réactions générales que d'un corps voisin du carotène, de cette large famille encore assez mal connue que TSWETT a dénommée : les Carotinoïdes, nom adopté par TOBLER (1912) et par les biologistes en général.

Présence de Carotinoïdes dans la série animale.

La présence de carotinoïdes dans la série animale paraît être très générale. L'étude de cette question est à l'ordre du jour, à en juger par le nombre assez grand de travaux qui ont paru sur elle depuis une dizaine d'années et elle comporte un intérêt biologique considérable. Ces résultats étant très dispersés dans la littérature scientifique, je crois bon de les exposer ici brièvement de manière à rattacher ceux que j'ai obtenus chez les Crustacés à une question d'une portée plus générale.

Chez les Végétaux, les carotinoïdes sont actuellement assez bien connus et identifiés, surtout grâce aux travaux de : ARNAUD (1885), WILLSTÄTER et MIEG (1907), EULER et NORDENSON (1908), WILLSTÄTER et ESCHER (1910), TSWETT (1911), TOBLER (1912). C'est maintenant un ensemble chimique homogène, comprenant des isomères et des corps voisins : Hydrocarbures et composés oxygénés. Chez les animaux, l'étude est beaucoup moins avancée, en raison surtout de la difficulté de l'extraction des corps en question, presque toujours mélangés à des graisses. Un certain nombre d'auteurs ont pensé à rapprocher dans cet ordre d'idées, les pigments animaux des pigments végétaux. Mais des confusions de noms ont compliqué la question et l'emploi des mots lutéine ou lipochrome a retardé cette homologation en portant à croire qu'il s'agissait de composés différents.

THUDICHUM (1869) réunissait cependant, sous ce nom de lutéine, tous les pigments jaunes, aussi bien végétaux

qu'animaux. CAPRANICA (1877) rapprocha le pigment des corps jaunes de la carotène. MEREJKOWSKI (1883) pense aussi qu'il y a des pigments communs aux plantes et aux animaux, mais il met de façon assez singulière la carotène hors de question, en la déclarant soluble dans l'eau. HEIM (1892), groupe aussi tous les pigments jaunes ou rouges dans une même classe, qu'il s'agisse du pigment de la carotte, de celui des feuilles ou des fruits, ou qu'il s'agisse de la tétronérythrine décrite par WURM (1871), du pigment des criquets de KÜNCKEL d'HERCULAI, des pigments des poissons ou de ceux du sérum, de la graisse et des corps jaunes. BLANCHARD, ZOPF, KEEBLE et GAMBLE, nous l'avons vu, ont rapproché à nouveau les pigments animaux, en l'espèce des Crustacés, de la carotène. Jusqu'à présent, exception faite des travaux de ZOPF, c'est un simple rapprochement qui a été fait entre les pigments animaux et végétaux. Aucune démonstration chimique n'a été donnée de cette ressemblance. Il faut arriver à des travaux tout récents pour avoir des précisions à ce sujet. Ces travaux se sont surtout adressés aux vertébrés.

WILLSTÄTER et ESCHER (1911) ont isolé du jaune d'œuf, à l'état cristallisé, une xanthophylle qui représente la lutéine colorant ce jaune.

ESCHER s'adressa aux corps jaunes de la vache et après traitement de 146 kilogrammes de matériel provenant de 10.000 vaches environ, obtint un pigment rouge dont il fit l'analyse élémentaire et qu'il démontra être un carotène. A la suite de ce résultat, ESCHER tend à homologuer au carotène ou aux xanthophylles, tous les corps décrits sous le nom de lutéine et de lipochrome.

FISCHER et ROSE (1913), en observant du carotène cristallisable dans les calculs biliaires de la vache, puis surtout PALMER et ECKLES (1914) contribuèrent à vérifier cette hypothèse. Ces derniers auteurs, dans une suite de travaux, ont étudié les pigments qui colorent le beurre, le lait, le sérum sanguin et la graisse du corps, spécialement de la vache et de l'homme. Ils se sont basés sur l'étude des caractères physiques, propriétés de solubilité, propriétés d'adsorption en présence

de craie, caractères spectroscopiques en solution dans le sulfure de carbone, estimant ces caractères suffisant à la démonstration des pigments, pour un biologiste familiarisé avec ces recherches. C'est ainsi qu'ils concluent que le pigment principal des tissus énoncés plus haut est le carotène et accessoirement, en quantité variable, le xanthophylle.

SCHULZE (1914), est tout à fait affirmatif dans son étude sur les corps du groupe carotène chez les insectes, au sujet de l'homologie des pigments animaux et végétaux. HOLLANDE (1914) décrit dans les œnocytes des Insectes, un pigment carotinoïde. Enfin, tout dernièrement, HESS et MYERS (1920) ont reconnu la présence de carotène dans le sang humain, dans un cas accidentel.

On voit, étant donné la large répartition des carotinoïdes, combien est grand l'intérêt biologique d'une telle question. J'aurai l'occasion d'y revenir, dans le chapitre suivant.

5° Histochimie de la Zooérythrine. — J'ai montré, à propos du pigment amino-acide, les différents buts que l'on se proposait en transportant sous le microscope les réactions étudiées *in vitro*. Ce sont : 1° L'identification de la zooérythrine dans les tissus, sans recourir à l'extraction par les méthodes chimiques ; 2° Comme corollaire du paragraphe précédent, les applications à la technique histologique.

Etude du substratum de la Zooérythrine. — J'ai montré que c'est dans les chromatophores que la zooérythrine se rencontrait à l'état non combiné. C'est dans ces éléments que son étude histochimique doit être poursuivie. Toutefois, nous avons vu que c'est à l'état amorphe, en flaques ou en boules, que le pigment s'y rencontre. Il n'est jamais cristallisé, comme on l'a parfois décrit chez les Végétaux, et l'obtention du produit cristallisé *in vitro* nécessite une série d'opérations chimiques.

Ce fait tient à ce que la zooérythrine apparaît sur un substratum dans lequel elle est dissoute. Ce substratum est de nature lipoïde et vraisemblablement formé de lécithines. En effet, lorsque l'on traite par l'acétone les érythrophores, la zooérythrine est dissoute et le substratum persiste sous un aspect plus ou moins réfringent, colorable en gris-jaune, par le tetroxyde d'osmium, et en orangé par le Soudan III de Daddi. Ce sont là des caractères des lécithines (LOISEL, 1903). J'ai, de plus, obtenu sur le produit extrait la réaction des cristaux de FLORENCE caractéristiques de la choline résultant de l'hydrolyse de la lécithine. La présence de cette lécithine, formant un substratum, contribuent à donner au pigment brut l'aspect que nous avons vu. C'est à elle aussi qu'il faut attribuer la solubilité assez grande de la zooérythrine dans l'alcool, alors que le carotène y est peu soluble. Elle ne gêne du reste pas autrement, comme je vais le montrer, l'obtention des réactions fondamentales des carotinoïdes.

C'est le carotène qui forme la substance principale de la zooérythrine et c'est l'identification de ce corps qu'il conviendrait de rechercher. Parmi les propriétés que j'ai étudiées au cours des paragraphes précédents comme appartenant au carotène, un certain nombre sont communes à un ensemble de corps qui sont les carotinoïdes, d'autres sont caractéristiques de l'hydrocarbure carotène en particulier. Ces dernières, si l'on met à part la composition chimique établie par l'analyse élémentaire, sont représentées surtout par les caractères d'adsorption et les bandes d'absorption du spectre. L'étude de ces propriétés ne peut guère être transportée sur le tissu même. Restent donc seules praticables les réactions communes aux

carotinoïdes et la conclusion de ce paragraphe sera que, si l'identification des carotinoïdes est pour l'histo chimiste une chose aisée, il ne lui est pas possible de séparer les différents corps de cette famille chimique.

Identification histo chimique des Carotinoïdes. — Propriétés physiques. Solubilité. — On doit essayer les caractères de solubilité d'après ceux que j'ai donnés pour le pigment brut extrait des érythrophores.

Cristallisation. — Il existe, en technique végétale, un certain nombre de méthodes ayant pour but de faire cristalliser le carotène dans les tissus. Ce sont celles de MOLISCH, de TSWETT et de FRANK-TSCHIRCH. Je renvoie pour leur application aux articles de TSWETT (1911) et de SCHULZE (1913) et n'y insiste pas ici, n'ayant jamais obtenu avec elles de résultat chez les Crustacés.

Identification basée sur les propriétés chimiques. — La première de ces propriétés est l'oxydabilité. Elle peut aisément se rechercher sur les tissus. Un fragment d'hypoderme contenant les érythrophores, étalé sur une lame, est placé sous une cloche remplie d'oxygène ou simplement d'air, à une douce chaleur. Au bout d'un temps variable, le pigment s'est décoloré. Cette oxydation, traduite par la décoloration peut être réalisée très rapidement en traitant les chromatophores par une solution d'acide chromique ou d'un bichromate alcalin. Dans l'un et l'autre cas, on obtient un mélange du substratum lipéide et du pigment oxydé, colorable par le Soudan III et réduisant également le tetroxyde d'osmium qui n'est pas réduit avant l'oxydation.

Les composés oxygénés étant incolores ne peuvent être suivis au sein des tissus. Il est certain que la zooérythrine s'oxyde normalement dans l'organisme des crustacés. Il ne semble pas que cette oxydation ait lieu directement dans les chromatophores d'une manière générale, si l'on met à part le cas de *Palæmon*, où l'on voit la zooérythrine des chromatophores passer dans les chromorhizes à une teinte jaune, puis se décolorer à leur extrémité. J'ai déjà signalé ce fait (Pl. II, fig. 6).

La formation d'un composé iodé est un caractère important des carotinoïdes. D'autres corps donnent, avec l'iode, une réaction colorée, mais d'une teinte différente. Ce sont : l'amidon qui se colore en bleu, la substance amyloïde et le glycogène en brun acajou. Avec les carotinoïdes et le carotène des Crustacés en particulier, la teinte est d'un brun violet presque noir. Il suffit pour l'obtenir d'arroser avec une solution iodo-iodurée étendue, le tissu à étudier. La coloration est réalisée au bout de quelques minutes. Elle disparaît par un chauffage assez fort, mais ne reparait pas par refroidissement. Il faut ajouter à nouveau du réactif iodé. Cette réaction a été obtenue par SCHMIDT (1917), chez les reptiles, avec une teinte bleue, par HOLLANDE dans les cérodécytes des Insectes avec la même teinte. Aucun auteur ne l'a encore réalisée chez les Crustacés et je m'étonne que HEIM déclare qu'elle n'a pas lieu et se base sur ce résultat négatif, pour distinguer les « lutéines végétales des lutéines animales ». Une telle distinction est absolument fautive. Tous les pigments contenant des carotinoïdes donnent la réaction de l'iode et il y a lieu de la généraliser en histochimie animale. Elle permet la mise en

évidence des plus petits grains contenant le pigment (Pl. II, fig. 7).

On identifiera enfin les carotinoïdes par une troisième réaction, la plus anciennement connue : la coloration bleue en présence d'acide sulfurique concentré, ou bleu verdâtre en présence d'acide azotique. Elle est donnée par tous les corps décrits sous le nom de lipochrome ou de lutéine et tend à prouver que tous ces corps contiennent des carotinoïdes. Cette réaction doit être observée extemporanément car, ne pouvant être obtenue que par les acides concentrés, elle amène la destruction rapide des tissus. La teinte bleue est du reste assez fugace, elle se dissout dans l'acide en excès au fur et à mesure de sa production.

Ces différentes épreuves sont nécessaires et suffisantes pour établir histochimiquement la présence de composés carotinoïdes, mais, je le répète, incapables de décider auquel d'entre eux on a à faire. Aussi provisoirement, comme le remarque déjà SCHULZE (1913), l'histologiste doit « s'en tenir à la notion de carotinoïde, tout comme il s'en tient à celle d'albuminoïde » qui comprend une série de corps ayant des réactions communes mais qui sont difficiles à distinguer les uns des autres.

Applications à la technique. — Si l'on met à part l'examen à l'état frais et les coupes par congélation, la zooérythrine, en raison des caractères de solubilité de ses constituants, ne peut être étudiée par des méthodes histologiques. En raison de son altérabilité, le pigment lui-même ne peut être fixé et l'on ne peut songer comme pour le pigment amino-acide, à le conserver à l'état naturel sur les coupes. Mais si l'on veut se contenter de

le laisser *in situ* dans les chromatophores qui le contiennent, sans vouloir le conserver avec ses propriétés physico-chimiques, il y aura un moyen de tourner la difficulté. C'est ce moyen que j'ai utilisé dans la description du chondriome des érythrophores et de l'évolution de la zooérythrine. Il consiste précisément à mettre à profit l'oxydabilité de ce pigment et à se servir des propriétés du produit oxydé. J'ai indiqué brièvement quelles étaient ces propriétés. J'y reviens ici au point de vue spécial de la technique histologique. J'ai pratiqué les essais nécessaires, en oxydant du pigment isolé *in vitro* et en le traitant sur lame par les réactifs utiles.

Le produit d'oxydation du pigment devient, par une chromisation d'une douzaine de jours environ, insoluble dans l'alcool et les solvants organiques. On peut alors fixer sur lui une laque d'hématoxyline. Cette réaction n'a évidemment rien de spécifique, mais elle peut, comme je l'ai dit, rendre service quand on a repéré à l'état frais la situation des chromatophores. Il faut, de plus, tenir compte du rôle joué dans ces opérations par le substratum lipéide du pigment.

Lorsqu'on aura à traiter une pièce on pourra donc procéder de la manière suivante : immerger le tissu dans une solution d'acide chromique à 1 % ou de bichromate de potassium à 3 %. La zooérythrine sera d'abord oxydée, puis le produit d'oxydation se chromera progressivement. Au bout d'une douzaine de jours, on lavera à l'eau courante et l'on procèdera à une coloration par une laque d'hématoxyline suivant les procédés connus.

2 Partie. — Pigment dérivé de la zooérythrine par combinaison protéique ou Carotinalbumine.

Il existe dans les téguments, spécialement dans la carapace et dans les œufs des Décapodes, un pigment de teinte variable suivant les espèces. Ses caractères les plus frappants sont d'être insoluble dans les solvants organiques neutres (sulfure de carbone, éther de pétrole, tétrachlorure de carbone, etc.) qui dissolvent la zooérythrine et de se décomposer sous l'action de différents facteurs en régénérant un pigment rouge. Cette décomposition est surtout évidente lorsqu'on s'adresse à un Crustacé où le pigment en question est bleu ; le brusque changement de coloration qui en résulte a depuis longtemps excité les curiosités les moins scientifiques. Chez les Décapodes dont la carapace est, à l'état vivant, rouge (*Palinurus*) ou brune (*Cancer*), la transformation, pour n'être pas aussi apparente n'en existe pas moins. Le pigment rouge qui résulte de cette décomposition est de la zooérythrine de tous points identique à celle qui est contenue dans les chromatophores, comme l'indique l'étude de ses propriétés physiques et chimiques.

Historique

Je ne cite que pour mémoire, la conception ancienne de POUCHET, qui a supposé que le pigment bleu des Crustacés pouvait n'être que de l'hémocyanine. Son auteur lui même est revenu sur cette opinion insoutenable. Si on la met à part, on voit que tous les auteurs, à commencer par POUCHET lui-

même (1876), ont cherché à saisir les liens qui unissaient la zooérythrine et le pigment de la carapace et des œufs KRUKENBERG et HEIM, ne se doutant pas de la composition élémentaire simple de la zooérythrine, admettaient que cette dernière dérivait de l'autre pigment qu'ils appelaient pour cette raison, lutéogène ou lipochromogène. Je n'ai pas à insister sur les causes que HEIM attribue au changement de la couleur rouge en bleue et qui sont du domaine de la fantaisie, la déshydratation étant, pour lui, capable d'opérer le changement de couleur dans les deux sens. NEWBIGIN a renversé la proposition et a fait dériver le pigment bleu, qu'elle a plus spécialement étudié, de la zooérythrine, qu'elle supposait unie à une base organique complexe pour former ce pigment. KEEBLE et GAMBLE, en étudiant le pigment bleu nocturne d'Hippolyte, ont admis qu'il se produirait aux dépens des pigments rouge et jaune et ils ont cherché à établir sous la dépendance de quels facteurs était cette transformation. Ils ont constaté qu'une substance acide apparaît périodiquement dans le foie et les muscles. L'apparition et la disparition de la substance acide correspond grossièrement au changement de couleur nocturne et diurne et les auteurs anglais y voient la cause de ce changement. Pour BOHN (1901) le pigment rouge, qu'il appelle lipochrome, se transforme en bleu sous l'influence de l'activité musculaire. Les espèces peu actives de profondeur sont rouges, les littorales très actives sont envahies par le bleu. Les mouvements musculaires entraîneraient une intoxication particulière d'où résulterait la transformation pigmentaire. Outre que cette théorie ne dit rien sur la composition du pigment dérivé et qu'elle établit une confusion entre la zooérythrine et son dérivé rouge, elle est très discutable comme du reste la plupart de celles émises par BOHN dans son fascicule sur l'évolution du pigment.

Il suffit, pour démontrer son peu de fondement, de penser entre une foule d'exemples, à deux espèces comme *Portunus puber* et *Portunus depurator*, toutes deux vivant en pleine eau et très actives et dont la première est bleue et la seconde rouge.

**Détermination de la nature du pigment dérivé
de la zooérythrine**

Ses propriétés. — Le pigment dérivé ne se montre soluble que dans l'eau ou dans les solutions de sels neutres très diluées, ainsi que l'avaient déjà remarqué POUCHET et NEWBIGIN. Si l'on s'adresse à d'autres corps liquides, ou bien le pigment y sera insoluble (ce qui est le cas des solvants organiques neutres), ou bien il sera décomposé par eux (acides, alcalis, alcools méthylique, éthylique, amylique, éther sulfurique, les sels de métaux lourds). Il est également décomposé par la chaleur.

Le pigment dérivé a une teinte bleue chez : *Homarus*, *Aslucus*, *Galathéa*, *Porcellana*, *Hippolyte*, *Athanas*, *Palæmon*, *Portunus puber*, et rouge plus ou moins brunâtre chez la plupart des *Brachyours*, chez *Palinurus*, *Nephrops*, *Dromia*.

Les dérivés bleu et rouge paraissent coexister chez *Carcinus* et chez les différentes espèces de *Pagures*.

Si l'on met à part ce caractère de coloration, les propriétés du pigment dans l'un et l'autre cas se montrent identiques.

Il est facile, grâce à sa solubilité dans l'eau distillée, d'obtenir une solution du pigment dérivé, surtout si l'on s'adresse aux œufs ou à l'hypoderme, lorsque ce dernier en contient, comme chez *Astacus*. Dans la carapace le pigment dérivé est comme emprisonné et est plus difficile à obtenir. C'est une telle solution que VEGEZZI a obtenu en traitant par l'eau les œufs de *Maia* et non, comme il le croit, une solution de zooérythrine. Du reste à la fin de son travail, cet auteur revient sur sa première opinion et se demande s'il ne s'agit pas là en réalité « d'une combinaison de tétronérythrine et de protéines ».

La solution que l'on obtient, bleue ou rouge suivant le Crustacé auquel on s'adresse, est limpide. Elle présente tous les caractères du pigment qu'elle tient en solution colloïdale, c'est-à-dire que, par aucun solvant organique neutre, on ne peut en extraire de couleur et qu'elle est facilement décomposée par une série de facteurs physiques et chimiques. Si l'on étudie cette décomposition, on voit qu'elle consiste en l'apparition d'un précipité floconneux coloré en rose ou en rouge, suivant la concentration, mais quelle que soit la couleur du pigment dérivé, et se rassemblant plus ou moins vite. Le liquide surnageant est de l'eau. Le précipité, traité par un solvant neutre, cède maintenant complètement le pigment qu'il a entraîné en précipitant et qui n'est autre que de la zooérythrine. Le précipité lui-même offre les réactions colorées des protéiques : biuret, MILLON, xanthoprotéique.

D'autre part, si l'on considère quels sont les agents qui déterminent la décomposition du pigment dérivé, on constate que, soit physiques : chaleur, soit chimiques : alcool, acides, etc., ce sont tous des agents qui coagulent les matières protéiques, plus spécialement les protéines, ou les décomposent (alcalis). Le pigment dérivé nous apparaît ainsi comme un composé protéique de la zooérythrine.

Je me suis efforcé de déterminer avec quel protéique cette combinaison avait lieu : albumine ou globuline. Le fait que le pigment dérivé est soluble dans l'eau pure et que cette solution peut être diluée d'eau à un volume quelconque, sans précipiter, est déjà un argument en faveur d'une albumine. Il n'y a pas davantage de précipitation si l'on sature la solution de sel marin ou de

sulfate de magnésie ou si on la sature à moitié de sulfate d'ammoniaque. Elle a lieu, au contraire, si on sature de sulfate d'ammoniaque ou si on acidifie très légèrement la solution saturée de sulfate de magnésie. C'est donc bien d'une albumine qu'il s'agit et le précipité obtenu avec le sulfate d'ammoniaque, est à nouveau soluble dans l'eau. En effet, après la précipitation par les sels neutres, qui serait un phénomène purement physique, les précipités obtenus se redissolvent si l'on dilue par addition d'eau. Au contraire, dans les coagulations que j'ai indiquées tout à l'heure, la matière protéique est insolubilisée par action chimique. Dans le premier cas, à l'opposé du second, le pigment n'est pas dissocié et la zooérythrine n'apparaît pas.

Les acides forts, même dilués, ainsi que l'acide acétique concentré, dédoublent le pigment et en séparent la zooérythrine, ce qui est surtout apparent pour le dérivé bleu. Mais, dans ces cas là, la dissociation n'est pas due à la coagulation de l'albumine qui reste en solution. L'action de ces réactifs doit porter sur le point d'union de la combinaison, qui paraît assez fragile. L'anhydride carbonique et l'acide osmique sont sans action (KEEBLE et GAMBLE). La coagulation par la chaleur a lieu entre 81° et 90°. Elle est complète à cette dernière température. Ainsi, il faut considérer le pigment dérivé comme une combinaison des pigments de la zooérythrine avec une albumine. Ces pigments étant des carotinoïdes, je donnerai au pigment dérivé le nom de carotinalbumine. Ce nom est calqué sur celui du pigment respiratoire des vertébrés, avec lequel, si elle n'a pas de ressemblance physiologique, la carotinalbumine a une similitude de constitution chimique. Dans les deux cas,

on a à faire à une matière protéique (albumine ou globuline), à laquelle est combiné un groupement prosthétique qui est un pigment (carotine ou hématine). La nature intime de la combinaison ne nous est pas connue. Peut être, le secret en est-il dans la présence d'un lipide phosphoré, comme le supposent PALMER et ECKLES. Mes résultats, que j'ai obtenus avant de connaître les travaux de ces auteurs, sont à rapprocher des conclusions auxquelles ils ont abouti, en étudiant la façon dont chez la vache, le carotène pouvait circuler dans le sérum. Ils ont constaté que ce pigment y existait à l'état de combinaison avec une albumine. Cette combinaison paraît donc générale dans la série animale. Elle est beaucoup plus abondante chez les Crustacés Décapodes et s'y présente sous deux aspects différant seulement par le caractère physique de la couleur. C'est un caractère secondaire. Je n'ai pu établir aucune sorte de différenciation chimique, entre les deux sortes de carotinalbumine. J'ai montré qu'il existe sans doute des Carotènes isomériques chez les Crustacés. Il se peut que là soit l'explication et que les combinaisons protéiques des isomères diffèrent par la couleur. Peut-être y a-t-il aussi, suivant les espèces de crustacés, des proportions variables de carotinoïdes entrant dans la combinaison, le carotène n'étant pas seul à en faire partie, mais aussi les pigments très proches de lui que j'ai signalés.

La combinaison bleue paraît analogue à celle que l'on rencontre chez d'autres invertébrés et notamment au pigment bleu de *Velella* et *Porpita*, connu sous le nom de Velelline.

Ces données nous permettent d'expliquer des phénomènes que l'on constate couramment. Si la carapace

d'un homard rougit en cuisant, c'est que la carotinalbumine qui lui donnait sa teinte bleue, coagulée par la chaleur, est dissociée. Les carotinoïdes sont libérés et leur teinte rouge apparaît. Le processus est le même lorsque l'on conserve le même homard dans l'alcool. La carotinalbumine est coagulée et les carotinoïdes libérés se dissolvent peu à peu dans l'alcool, où ils s'oxydent du reste. De même, après la mort de l'animal, les carotinalbumines se dissocient et la teinte rouge apparaît.

Il résulte de la composition que j'attribue à la carotinalbumine, qu'il n'est pas possible de reconstituer *in vitro* ce pigment, en partant de la zooérythrine, pas plus qu'il n'est possible de reconstituer l'hémoglobine en partant de l'hématine. La chimie des matières protéiques n'est pas encore assez avancée pour pouvoir tenter des synthèses de ce genre.

Cristallisation de la carotinalbumine. — La carotinalbumine bleue est capable de cristalliser en cristaux aciculaires et c'est sous cette forme qu'on le rencontre, par exemple, dans l'hypoderme d'*Astacus*.

Spectre d'absorption. — VEGEZZI croyant examiner le spectre de la zooérythrine en solution aqueuse a, en réalité, observé celui de la carotinalbumine rouge, de *Maia*, en solution colloïdale dans l'eau. Il a trouvé deux bandes d'adsorption qui, par rapport à celles de la zooérythrine sont fortement déplacées vers le rouge.

Dialyse. — A la suite de PALMER et ECKLES et de VEGEZZI, j'ai constaté que les carotinalbumines étaient indialysables. A la longue, par la dialyse, la zooérythrine est libérée, mais elle ne dialyse pas davantage et s'oxyde sur place en se décolorant.

Les valences libres du carotène étant satisfaites dans la carotinalbumine, cette dernière ne présente pas les propriétés chimiques de l'hydrocarbure. Elle ne s'oxyde pas et ne forme pas de composé d'addition avec l'iode.

Répartition et situation des Carotinalbumines. —

On les rencontre dans les téguments et dans les œufs, mais elles ne sont jamais contenues dans un chromatophore, dans une cellule pigmentaire vraie.

La présence de la carotinalbumine est la règle dans la carapace où j'ai déjà étudié sa situation. Elle y est à l'état d'un fin pointillé imprégnant la couche pigmentaire.

Dans l'hypoderme, elle est, au contraire, plus rare et ne s'y rencontre qu'à l'état de pigment bleu. Elle revêt deux aspects : 1° sous forme de cristaux ; 2° à l'état liquide imprégnant les tissus de l'hypoderme.

1° Sous forme de cristaux, la carotinalbumine a été décrite sous le nom de cyanocristalline ou de cœrulins. FOCILLON, et surtout POUCHET, en ont donné de bonnes descriptions. Les cristaux sont sous forme de batonnets biréfringents de $8\ \mu$ de long sur $0\ \mu$, 5 à $1\ \mu$. Ils sont associés ou isolés (fig. 8, pl. II). Ils sont généralement contenus dans les cellules épidermiques et se rencontrent jusque dans la muqueuse de l'estomac chez *Astacus*. On peut aussi voir fréquemment ces cristaux dans des éléments arrondis qui, en raison de leur situation au milieu de l'hypoderme, doivent être considérés comme des amibocytes ;

2° A l'état liquide, le pigment bleu imprègne l'hypoderme d'une manière uniforme. On l'y voit d'une manière constante, comme chez *Palæmon*, ou n'apparaissant que la nuit, comme chez *Hippolyte*, dont les curieuses

variations de coloration ont été étudiées par KEEBLE et GAMBLE.

Œufs. — La carotinalbumine se rencontre également dans les œufs des Décapodes d'une manière constante et, fait remarquable, elle revêt la même coloration que dans la carapace, c'est-à-dire que, chez un Crustacé, c'est la même carotinalbumine qui imprègne carapace et œufs.

La seule exception à ce fait est à ma connaissance le cas du genre *Nephrops*, dont la carapace est rouge et dont les œufs sont verts. La carotinalbumine est toujours à l'état amorphe dans les œufs qu'elle imprègne de manière uniforme. Toutefois, à côté de ce pigment combiné, il existe souvent dans les œufs une petite quantité de pigment libre simplement dissous dans les corps gras dont le vitellus est richement pourvu. De la superposition de ces différentes teintes résultent les colorations variées qu'offrent les œufs des Crustacés : bleu, vert, orangé, rougeâtre.

Rapports histologiques des carotinalbumines avec la zooérythrine. — Un certain nombre de faits histologiques viennent confirmer l'origine des carotinalbumines aux dépens de la zooérythrine contenue dans les chromatophores.

C'est d'abord le fait que la carotinalbumine apparaît toujours en regard des érythrophores. Lorsque ce pigment dérivé est contenu dans l'hypoderme, il forme autour des chromatophores une véritable atinosphère (fig. 6, Pl. II). Parfois les cellules épidermiques, bourrées de cristaux bleus, représentent comme le décalque chimique des chromatophores.

Le pigment bleu qui imprègne tout l'hypoderme apparaît toujours en formant une auréole autour des érythrophores. Il y a deux exceptions :

C'est l'épiderme de l'estomac d'*Astacus*, où apparaissent sous forme de lignes longitudinales des cristaux de carotinalbumine bleue, sans qu'on trouve dans la région d'érythrophores, et ce sont les œufs où la carotinalbumine se forme aussi sans voisinage de chromatophores. Il est probable que dans ces deux cas les carotinoïdes destinés à l'édification de la carotinalbumine sont transportés par voie sanguine.

La carapace est fortement colorée au-dessus des régions où l'hypoderme est le plus riche en érythrophores et les zones où ces derniers sont absents se traduisent par des zones incolores sur la carapace. Comme conséquence, la carapace est très peu colorée chez les Décapodes qui possèdent peu d'érythrophores comme *Nephrops*, comme les Carcins jeunes, et surtout comme *Crangon*, qui rougit à peine à la cuisson.

Histochimie des Carotinalbumines. — Etant donné que la caractéristique d'une fixation histologique est la coagulation des substances protéiques, il est évident que d'aucune façon il ne sera possible, dans ces conditions, de conserver les carotinalbumines. Le seul mode d'examen reste l'examen à l'état frais par étalement ou dissociation. J'ai pu obtenir également des coupes par congélation directe d'œufs ou de la paroi stomacale chez *Astacus*.

L'identification des carotinalbumines, observées dans les tissus, sera aisée. Il suffira de traiter directement par un excès d'alcool éthylique fort. Le pigment sera immé-

diatement dissocié et l'alcool se colorera peu à peu en rouge. On aura vérifié, au préalable, que le pigment observé n'était pas directement extrait par l'éther de pétrole ou le chloroforme.

S'il n'y a pas de moyen de fixer histologiquement les carotinalbumines, j'ai déduit de mes observations un procédé pour les conserver au moins avec leurs couleurs dans les tissus. Il suffit de conserver les pièces dans une solution saturée de sulfate d'ammoniaque.

La carotinalbumine est précipitée sur place, mais sans être décomposée. Dans le cas de la combinaison bleue, la couleur est magnifiquement conservée et d'une façon qui paraît indéfinie.

J'ai constaté que les pièces se conservaient également bien dans une solution saturée de sulfate de magnésie. Dans ce cas, les globulines sont seules précipitées ; la carotinalbumine ne l'est pas. On peut, si l'on veut la précipiter, ajouter quelques gouttes d'acide acétique à la solution de sulfate de magnésie. La carotinalbumine n'est pas, non plus, décomposée dans ces conditions, mais la préparation perd de la transparence. Le traitement par le sulfate de magnésie suffit : la carotinalbumine reste emprisonnée dans la carapace dans le cas de cette dernière. S'il s'agissait d'hypoderme, le pigment entrerait facilement en solution et, seul, le sulfate d'ammonium serait utilisable.

Ces méthodes peuvent, je crois, rendre service pour la conservation anatomique des couleurs des Crustacés, lorsque ces couleurs sont dues, comme chez les Décapodes, à des carotinalbumines.

CHAPITRE VII

Problèmes biologiques soulevés par l'étude des pigments des Crustacés Décapodes

Dans les chapitres que j'ai consacrés à mon étude personnelle des pigments des Crustacés Décapodes, j'ai tenu à exposer d'une façon aussi précise et positive que possible les faits ayant trait à la constitution et à la formation des pigments. Cette étude doit permettre au biologiste de s'élever à des considérations plus générales.

Un pigment représente une phase figurée et naturellement colorée du métabolisme de composés, résultant des réactions, normales ou pathologiques, de la substance vivante et différents selon la nature chimique du pigment que l'on envisage.

A partir de cette phase, facile à observer, il sera possible, dans de meilleures conditions, de pénétrer les secrets de ce métabolisme et l'étude des pigments sera ainsi susceptible d'éclairer bien des points de la biologie. Je vais consacrer ce chapitre à envisager quels sont, chez les Crustacés Décapodes, les aperçus que peuvent permettre les observations que j'ai faites au cours des

chapitres précédents. Je poserai des problèmes qu'il ne me sera pas toujours possible de résoudre, mais du moins apportant des arguments, je montrerai combien peut être féconde une investigation ayant pour point de départ les pigments.

Les questions que je soulèverai au sujet de chaque pigment concerneront son origine d'une part, sa destinée de l'autre. J'envisagerai du même coup quelle interprétation biologique on peut donner de ce métabolisme.

Types pigmentaires chez les Décapodes

Je rappellerai que les Crustacés Décapodes peuvent présenter deux types pigmentaires principaux.

L'un, dont *Cancer pagurus* est un exemple, possède de la zooérythrine, du pigment amino-acide et de la mélanine.

L'autre, dont *Homarus vulgaris* est le représentant, possède de la zooérythrine et un pigment amino-acide qui n'évolue point en mélanine.

Au type I se rattachent tous les Brachyours et le genre *Crangon* avec toutes ses espèces. Au type II, tous les Anomours et les Macroures (moins *Crangon*).

Chacun de ces types peut présenter, à son tour, deux aspects différents suivant que le composé protéique de la zooérythrine est bleu ou rouge. De sorte qu'en résumé, on rencontre chez les Décapodes quatre facies pigmentaires dont les espèces suivantes peuvent être prises comme exemples : *Stenorhynchus phalangium*, *Portunus puber*, pourvus de mélanine et respectivement rouge et bleue. *Astacus fluviatilis*, *Palinurus vulgaris*, sans mélanine, respectivement bleue et rouge.

Cette classification, en ce qui concerne les dérivés de la zooérythrine, n'a rien d'absolu. Ainsi que je l'ai montré, les composés bleu et rouge peuvent coexister chez le même animal, ce qui crée une série de types intermédiaires, tels que les Pagures ou les Carcins.

Crangon, seul macroure pourvu de mélanine, paraît un type aberrant. Sa mélanine n'est, du reste, pas entièrement semblable à celle des Brachyours, comme je l'ai signalé.

Pigment amino-acide

Origine. — Etant donné la composition de ce pigment, on doit se demander s'il représente un produit de désintégration des substances protéiques ou, au contraire, une substance de réserve capable de reconstituer des molécules albuminoïdes. Le pigment est-il formé sur place aux dépens de protéiques existant dans le sang, ou bien, préexiste-t-il dans ce milieu sous une forme plus simple, n'étant que fixé par les amino-acidophores ? Dans le premier cas, il faudrait faire intervenir l'existence, dans ces cellules, d'un ferment protéolytique ; dans le deuxième cas, cette protéolyse se passerait dans les divers tissus de l'organisme. La présence du pigment amino-acide est très constante chez les Décapodes et doit être le résultat d'un métabolisme d'une grande généralité.

Destinée. — J'ai montré que chez un crustacé donné, le taux du pigment amino-acide était très sensiblement constant, en mettant à part, bien entendu, les régions où il se transforme en mélanine. On constate, cependant,

que l'élaboration du pigment autour des vaisseaux dans les couches profondes de l'hypoderme est continue. On doit donc se demander ce que devient le pigment qui disparaît. L'observation montre qu'à chaque mue la couche la plus superficielle se trouve incluse dans la zone de calcification, d'où résultera la nouvelle carapace qui sera, à son tour, rejetée à la prochaine mue et à laquelle le pigment amino-acide, dans les régions où il est particulièrement abondant, donne une teinte jaunâtre.

Interprétation biologique. — Ce rejet du pigment amino-acide semble prouver qu'il s'agit d'une substance inutilisable par l'organisme, sinon nuisible. J'ai voulu me rendre compte, en faisant jeûner des Crustacés, si l'on assistait à des variations du taux du pigment. Une diminution prouverait qu'il s'agit d'une substance utilisable par l'organisme en l'absence de l'apport de substances azotées étrangères. Or, il n'en est rien. J'ai pu faire jeûner, dans un cas, quarante-cinq jours dans de l'eau de mer artificielle; dans un autre cas, trente-quatre jours dans un aquarium, à Luc-sur-Mer, des *Carcinus maenas*, ou des écrevisses gardées en captivité pendant cinq mois, sans observer de diminution du pigment amino-acide. Les animaux étaient en état d'inanition, comme le prouvait la disparition de toutes les réserves de l'hépatopancréas et l'appauvrissement complet de tous les tissus, y compris l'hypoderme. En raison de ce dernier fait même, le poids de l'hypoderme étant plus faible, le taux du pigment amino-acide % de tissu devenait légèrement supérieur à ce qu'il est à l'état normal. Il ne paraît donc pas que le pigment amino-acide puisse

être repris et utilisé par l'organisme. Dans ces conditions, étant donnée sa composition et les faits que j'ai rapportés, j'estime qu'il y a lieu de considérer le pigment amino-acide comme résultant de la désintégration des protéiques de l'organisme, par conséquent comme un produit excrémentitiel appelé à être rejeté progressivement au dehors par la voie cutanée et dont les amino-acidophores représentent des organes d'élaboration et d'accumulation.

Mélanine

Origine. — J'ai étudié longuement l'origine de la mélanine aux dépens du pigment amino-acide et les conditions nécessaires à cette transformation. J'ai montré que la condition essentielle était la présence de tyrosine contenue dans des produits de désintégration des matières protéiques assez avancés, ce qui n'était réalisé que chez une partie des Décapodes.

Destinée et interprétation biologique. — La genèse de la mélanine apparaît comme un épi-phénomène. Elle n'est en rapport avec le processus de désintégration qu'en tant que celui-là fait apparaître la tyrosine sous une forme oxydable. A ce point de vue, on peut admettre que tout produit d'hydrolyse protéique apparaissant dans le cytoplasma est susceptible de former de la mélanine, quels que soient son aspect morphologique et sa provenance, à condition, seulement, qu'il y existe un chromogène directement oxydable par une tyrosinase et que les conditions requises pour l'action du ferment soient réalisées. Il semble que d'autres corps puissent remplacer la tyrosine comme chromogène, le tryptophane ou l'adré-

naline notamment. SZILY, et surtout PRENANT, ont montré que le pigment mélanique pouvait avoir cytologiquement des origines bien diverses. Des mitochondries, différentes enclaves, des corps issus du noyau, peuvent contenir le chromogène qui se mélanisera.

J'ai montré que, à mon avis, la lumière ne devait pas, dans la formation de mélanine, jouer un rôle direct sur la réaction même, mais sur l'apparition du couple catalytique, spécialement de la tyrosinase, ou sur son activation dans les tissus par une partie au moins de ses radiations.

Aussi, je crois que l'on peut faire deux catégories d'albinos, en entendant par ce mot, les animaux qui n'élaborent pas de mélanine :

1° Les albinos vrais, chez qui la tyrosinase peut exister, mais chez qui il n'y a pas production de chromogène mélanisable par ce ferment. Ce sont les albinos qui vivent à la lumière dans les conditions où les autres individus ont de la mélanine;

2° Les albinos par adaptation, chez qui le chromogène existe, mais chez qui, ou la tyrosinase manque, ou les conditions de la mélanisation ne sont pas réunies. Ce sont les animaux vivant à l'obscurité. Il suffit, pour faire cesser leur albinisme, de les transporter à la lumière. La mélanine se forme. C'est un fait bien connu que les animaux cavernicoles n'ont pas de mélanine et que cette dernière apparaît si on les fait vivre au jour.

L'absence de mélanine chez un grand nombre de Décapodes se rattache à la première de ces catégories. Elle tient à une différence essentielle dans le métabolisme de la désintégration des matières protéiques.

Cette hypothèse mécaniste de la formation de la méla-

nine s'oppose entièrement à la conception finaliste classique d'après laquelle le pigment mélanique jouerait un rôle dans la protection contre les radiations lumineuses. Positivement, il n'est pas plus logique de dire qu'il se forme chez les animaux de la mélanine, pour protéger les tissus sous-jacents contre l'action de la lumière, que de dire qu'une barre de zinc se recouvre, à l'air humide, d'une couche d'hydro-carbonate pour protéger sa profondeur contre l'action de cet air. Une explication scientifique doit indiquer les causes d'un phénomène, non sa finalité. En poursuivant ma comparaison, comme il est des métaux qui ne sont pas attaqués par l'air humide, il est des animaux qui ne forment jamais de mélanine : ce sont les albinos. Le finalisme est impuissant à expliquer leur existence.

Zooérythrine

Ce pigment est absolument constant chez les Décapodes,

Origine et interprétation biologique. — La question primordiale qu'il faut se poser au sujet de la zooérythrine est de savoir si ce pigment est élaboré par l'organisme animal ou simplement accumulé par lui, étant introduit avec les matériaux alimentaires. On admet, d'une manière générale (PALMER et ECKLES), que les organismes supérieurs sont incapables de faire la synthèse des hydrocarbures que sont les carotènes. Cette proposition est sans doute vraie en ce qui concerne, au moins, les mammifères et les oiseaux. Mais je crois que le carotène, qui constitue la partie essentielle de la zooé-

rythrine des Crustacés, est élaboré dans l'organisme de ces animaux. A l'appui de cette opinion, je fais valoir une série d'arguments.

Les premiers m'ont été fournis par l'examen histologique. L'un est basé sur les phénomènes observés dans les chromatophores et sur la localisation de ces éléments. J'ai montré que la formation de la zooérythrine était un véritable phénomène de sécrétion. Les chromatophores élaborent le carotène. Et, à cette élaboration, concourt une énergie étrangère, l'énergie empruntée aux radiations lumineuses. J'ai fait remarquer, en effet, que les érythro- phores ne pouvaient apparaître que dans les régions directement éclairées, c'est-à-dire dans les mêmes régions que la mélanine chez les Décapodes qui présentent ce pigment.

Les autres arguments sont d'ordre physiologique :

1° Pour accumuler une quantité de pigment égale à celle qui existe dans l'organisme d'un Crustacé, il faudrait que ce Crustacé fasse passer à travers son tube digestif une quantité considérable de substances végétales qui, ainsi qu'il a été reconnu, peuvent synthétiser le carotène mais n'en sont pas très riches en général. Or, ce n'est pas le cas; les Crustacés ont un régime avant tout carnivore;

2° Si le pigment avait une origine alimentaire, sa quantité devrait baisser pendant le jeûne. C'est ce qu'ont constaté PALMER et ECKLES chez la vache, dont le beurre se décolore quand on la prive des sources de carotène c'est-à-dire d'herbe. Chez les Crustacés, j'ai pu prolonger le jeûne jusqu'à l'inanition sans que le nombre des érythro- phores diminue et sans que la coloration s'atténue;

3° Le fait qu'il paraît exister des isomères du carotène, suivant les Crustacés, parle aussi en faveur de l'origine

endogène du pigment. On ne comprendrait guère que ces animaux, ayant une nourriture analogue, accumulent des carotènes non identiques, fait qui s'explique dans le cas de l'auto-synthèse.

Cet ensemble de faits me paraît très démonstratif. Le seul argument qui pourrait soutenir l'origine exogène de la zooérythrine est sa présence dans le sang. Mais ce fait peut aussi bien s'expliquer dans l'hypothèse de la formation endogène. Le sang, se chargeant de zooérythrine au contact des érythrophores, c'est par cette voie sanguine que le carotène est transporté aux œufs, où il forme la carotinalbumine que j'ai décrit. Chez les mammifères, qui n'élaborent pas leur carotène, on ne rencontre point d'érythrophores. On trouve le pigment simplement dans le sérum sanguin, les graisses et quelques organes.

Il est plus difficile de déterminer aux dépens de quels corps les chromatophores peuvent réaliser la synthèse de la zooérythrine. Il ne s'agit pas d'une synthèse, à proprement parler, puisque ce n'est pas en partant d'atomes d'hydrogène et de carbone que le pigment est formé, mais plutôt de la simplification d'un composé incolore appartenant à la même série chimique. NEWBIGIN, à la suite de MAC MUNN, estime que le pigment rouge, lipochrome pour elle, a son origine dans le pigment du foie ou hépatochrome. J'ai montré que parmi les corps résultant de l'oxydation du carotène se trouvait, en très petite quantité il est vrai, un corps ayant les réactions d'une cholestérine. La réaction pourrait être renversée et les cholestérines, présentes dans l'organisme, seraient le point de départ de la fabrication du carotène. Ce n'est là qu'une hypothèse toute gratuite ;

mais le fait que les deux composés se rattachent tous les deux à la série terpénique, parle en sa faveur.

Destinée. — On peut ainsi se représenter la zooérythrine comme élaborée dans les chromatophores, sur un substratum lipoïde, et seulement dans les régions directement éclairées de l'hypoperme. Dans l'organisme, la zooérythrine se rencontre sous deux états : dissoute dans les graisses, spécialement dans le sang, ce qui est également l'avis de SMITH et de ROBSON, ou combinée avec une albumine, ce qui est le cas dans la carapace ou l'hypoderme, au contact des érythrophores, et dans les œufs, au contact de la zooérythrine du sang.

Une partie de la zooérythrine est ainsi rejetée avec la carapace ; une autre quitte l'organisme, chez la femelle avec les œufs. Une autre quantité notable doit vraisemblablement s'oxyder, soit dans le sang, au niveau des tissus, soit autour des chromatophores.

Résumé et Conclusions

La morphologie ne peut, à elle seule, arriver à pénétrer la nature des pigments et à élucider les phénomènes de leur formation. Il faut, de toute nécessité pour cette étude, faire appel au concours de la chimie. Cette science peut collaborer avec l'histologie, soit par l'emploi de méthodes parallèles, soit par l'identification au sein même des tissus des composés, préalablement chimiquement définis et dont les réactions ont été reconnues *in vitro*.

Grâce à l'emploi de ces méthodes, je suis arrivé à établir chez les Crustacés décapodes l'existence de deux séries de métabolismes pigmentaires évoluant séparément : la série azotée d'origine protéique et la série des composés carotinoïdes. Ces métabolismes se traduisent par l'apparition, à la suite d'un véritable phénomène de sécrétion, dans des cellules dérivant du mésenchyme et dites chromatophores, d'un produit pigmentaire initial. Ce pigment une fois formé donne naissance, par des réactions diverses, à des dérivés soit dans le chromatophore même (série azotée), soit dans différents tissus de l'animal (série carotinoïde).

1° La série dite azotée est représentée par un pigment

formé de corps à fonctions amino-acides, produits de désintégration de matières protéiques, appelé pour cette raison pigment amino-acide, ce pigment apparaissant dans des amino-acidophores. Ces amino-acidophores évoluent dans l'hypoderme de la profondeur vers la surface. Cette évolution est différente chez les Décapodes à mélanine et chez les Décapodes sans mélanine. Chez les premiers, le pigment amino-acide se transforme en mélanine dans les régions directement éclairées et dans les zones les plus superficielles de ces régions. Cette transformation peut être suivie, dans les chromatophores, par l'examen histologique (fig. 2, 3, 4. Pl. I.), les granules de pigment amino-acide étant remplacés par des grains de mélanine. Chimiquement, elle est due à l'oxydation de tyrosine, contenue dans le pigment amino-acide, par une tyrosinase présente dans les téguments exposés à la lumière. Cette oxydation est précédée d'une désamination, qui se traduit par la diminution du taux de l'azote aminé soluble, extrait de la région d'hypoderme envisagée. Elle aboutit à la précipitation du pigment insoluble qu'est la mélanine, à la formation de laquelle participent les acides aminés linéaires associés à la tyrosine. Cette mélanogénèse peut être reproduite *in vitro* par l'action d'une tyrosinase sur l'extrait aqueux du pigment amino-acide. Chez les Crustacés sans mélanine, le pigment amino-acide, quelle que soit sa situation, n'évolue jamais en mélanine.

La cause de cette différence dans l'évolution des deux pigments amino-acides qui ont des traits communs, ayant un aspect morphologique assez semblable, étant tous deux solubles dans l'eau, doit être cherchée dans la composition des corps qui les forment. Dans le cas du

pigment amino-acide mélanisable, il s'agit de corps abiurétiques dans lesquels la dislocation des polypeptides composant les matières protéiques est poussée assez loin pour permettre à la tyrosine qu'ils contiennent d'être directement oxydable sous l'influence du ferment tyrosinase. Il s'agit dans ce cas de polypeptides très courts, sinon d'amino-acides libres. La dislocation doit au moins être poussée à ce point pour permettre la formation de mélanine. Quand le produit est biurétique, ce qui est le cas des autres Décapodes, et que la tyrosine n'est pas directement oxydable, il ne se forme pas de mélanine.

Cette dernière nous paraît ainsi comme une formation contingente, au cours de l'évolution d'un produit de dégradation des protéiques. Cette manière de voir ruine les conceptions finalistes attribuant au pigment mélanique un rôle de protection.

2° La série dite de la zooérythrine ou des composés carotinoïdes est représentée à l'origine par un pigment dont le composant essentiel est un hydrocarbure, très voisin du carotène végétal et en ayant toutes les propriétés. Cet hydrocarbure semble exister sous forme de deux isomères chez les Décapodes. D'autres pigments carotinoïdes lui sont sans doute associés. La zooérythrine existe en dehors des chromatophores, principalement à l'état de combinaison avec une albumine. Cette combinaison ou carotinalbumine est cristallisable. Elle se rencontre surtout dans la carapace à qui elle donne sa couleur et dans les œufs. Elle existe sous deux aspects, suivant les Crustacés : rouge ou bleu. Elle se dissocie avec la plus grande facilité par les réactifs qui coagulent l'albumine et régénèrent ainsi le pigment primitif (Cf. Pl II, fig. 6, 7, 8).

Je n'ai pas eu la prétention de faire une étude chimique complète de la zooérythrine. Mon but était de déterminer à quels composés ce pigment pouvait se rattacher, et seule, une recherche chimique pouvait fournir la réponse. C'est la recherche que j'ai tentée. Elle m'a permis de conclure que l'identification histochimique devait provisoirement s'arrêter aux Carotinoïdes, famille biochimique à laquelle se rattachent un nombre considérable de pigments végétaux et animaux.

A un point de vue plus général :

1° Cette étude permet de suivre histologiquement et chimiquement, sur un animal vivant, le processus de la mélanogénèse, dont elle dissocie les éléments en les analysant. Elle montre l'évolution du chromogène et les différentes phases de sa transformation *in vivo*, ce qui n'avait point encore été réalisé. Elle apporte ainsi une éclatante confirmation aux théories mécanistes de la mélanogénèse de VON FURTH, BERTRAND et CHODAT, qui avaient été seulement contrôlées *in vitro* ;

2° Elle montre un exemple indubitable de l'élaboration par un organisme animal d'un hydrocarbure, comme le carotène. La chimie et l'histologie s'associent ici encore, la première pour définir le corps formé, la deuxième pour montrer qu'il est le résultat d'un phénomène de sécrétion dans les chromatophores.

Index Bibliographique

- Abderhalden et Guggenheim.** — 1908. — Action de la tyrosinase de *Russula delica* sur la tyrosine, les polypeptides à tyrosine et quelques autres combinaisons. — *Zeit. phys. Chemie.* Bd. 54
- Abel et Davis.** — 1899. — On the pigment of the Negro's skin and hair. *Journ. of exper. med.* T. I.
- Agulhon.** — 1910. — Influence de la réaction du milieu sur la formation des mélanines par oxydation diastasique. *C. R. Acad. Sc. Paris.*
- Arnaud.** — 1885. — Recherche sur les matières colorantes des feuilles. *C. R. Acad. Sc. Paris.* T. 100.
- 1886. — Recherche sur la composition de la carotine. *Journ. de Pharm. et Chimie.* sér. 5. T. 14.
- Asvadourova.** — 1913. — Formation de quelques cellules pigmentaires et des pigments. *Arch. Anat. microsc.* T. 15.
- Bach.** — 1914. — Nature des réactions de la tyrosinase. *Bioch. Zeitsch.*
- Batelli et Stern.** — 1912. — Die oxydationsferment. *Ergebn. d. Physiol.* Ig. XII.
- Bauer.** — 1905. — Über einen objektiven Nachweiss der Simultankontrastes bei Tieren. *Abh. f. Physiol.* Bd 19.
- 1912. — Über die Ausnutzung strahlender Energie in intermediären Fettstoffwechsel der Garneelen. *Ztsch. f. allg. Physiol.* Bd. 13.
- Bergh.** — 1902. — Über die Gefässwandung bei Arthropoden. *Anat. Heft.* LXII. Wiesbaden.
- Bertrand.** — 1896. — Sur une nouvelle oxydase ou ferment

- soluble oxydant d'origine végétale. *C. R. Acad. Sc. Paris.*
- 1907. — Action de la tyrosinase sur quelques corps voisins de la tyrosine. *C. R. Acad. Sc. Paris.*
- 1908. — Recherche sur la mélanogénèse, etc.. *Bull Soc. Chimique.*
- Bertrand et Bourquelot.** — 1896. — La laccase dans les champignons. *C. R. Soc. Biol.*
- Bertrand et Muttermilch.** — 1907. — Sur l'existence d'une tyrosinase dans le son de froment. *C. R. Acad. Sc. Paris.*
- Biedermann.** — 1898. — Beiträge zur Vergleichenden Physiologie der Verdauung. *Pflugers Arch.*
- Blanchard.** — 1889. — Sur une carotine d'origine animale constituant le pigment rouge des Diaptomus. *C. R. Acad. Sc. T. 2.*
- 1890. — Idem. in *Mém. Soc. zoolog. de France.* T. III, 1^{re} partie.
- Bloch.** — 1917. — Das problem der pigmentbildung in der Haut. *Arch. Derm. Syphil.* CXXIV.
- 1917. — Chemische Untersuchungen über das spezifische pigmentbildende Ferment der Haut. *Zeitsch. physiol. Chemie.*
- Bloch et Ryhmer.** — 1917. — Histochemische Studien in überlebendem Gewebe über Pigmentbildung. *Zeitsch, gesamt. exper. Medizin.*
- Bohn.** — 1901. — L'évolution du pigment. *Scientia.* Paris.
- Bolk.** — 1908. — Über die segmentale Anordnung der Melanoblasten bei jungen Toleosteen. *Verh. anat. Ges.*
- Bottazzi.** — 1911. — Protoplasma und Körpersäfte. *Handbuch vergl. Physiologie.* Winterstein.
- Bourquelot.** — 1896. — Les ferments oxydants dans les champignons. *C. R. Soc. Biol.*
- Bütschli.** — 1899. — Untersuchungen über Strukturen nichtzelliger Erzeugnisse des organismus (Astacuspanser). *Leipzig.*
- Capranica.** — 1877. — (Sur le corps jaune de l'ovaire.) *Arch. f. Physiol.*
- Chodat et Staub.** — 1907. — Sur le mode d'action de la

tyrosinase, et : La spécificité de la tyrosinase et son action sur les produits de la dégradation des corps protéiques. *Arch. des Sciences phys. et naturelles* Genève 1907.

Chodat et Schweitzer. — 1913. — (Action de la tyrosinase.) *Bioch. Zeitsch.*

Cotte. — 1903. — Présence de tyrosinase chez *Suberites domunculus*. *C. R. Soc. Biol.* T. 55.

de Coulon. — 1920. — Etude du pigment d'un mélanome. *C. R. Soc. Biol.*

Damianovich et Guglielmelli. — 1909. — Contribution à l'étude des albuminoïdes. *Buenos-Ayres*.

Degner. — 1912. — Über Bau und Funktion der Krusterchromatophoren. *Ztschr. f. wiss. Zool.* Bd. 102.

Delaunay — 1910. — Contribution à l'étude du rôle des amino-acides dans l'organisme animal. *Thèse méd.* Bordeaux.

— 1913. — Répartition de l'azote restant du sang et du liquide cavitaires de quelques invertébrés. *C. R. Soc. Biol.* T. 74.

— 1913. — Les échanges azotés des Invertébrés. *Arch. Intern. de Physiologie.* T. 13, Liège, Paris.

Dewitz. — 1902. — Sur l'action des enzymes dans la métamorphose des Insectes. *C. R. Soc. Biol.*

Doffein. — 1904. — Brachyura. *Wissensch. Ergeb. d. deutsch. Tiefsee Expedition, Dampfer Valderia 1898-99.* Bd. 6. Jena.

— 1910. — Lebensgewohnheiten und Anpassungen bei Dekapoden Krebsen. *Festschrift z. 60 Geburtstag R. Hertwigs.* Bd. 3. Jena.

Durham. — 1904-05. — On the presence of the tyrosinase in the skins of some pigmented vertebrates. *Proc. of the roy. Soc. London.*

Eppinger. — 1910. — *Biochem. Zeitschr.*

Escher. — 1913. — Über den Farbstoff des Corpus luteum. *Zeitsch. physiol. Chemie. Hoppe-Seyler.* Bd. 83.

Euler et Nordenson. — 1908. — (Etude du carotène des carottes.) *Zeitsch physiol. Chemie.*

- Ewart.** — 1915. — On the function of chlorophyll. *Roy. Soc. Proceed.* B. 609.
- Fasal.** — 1913. — Méthode pour la préparation du pigment des poils. *Biochem. Zeitsch.*
- Fischel.** — 1896. — Beeinflussung der Pigmentierung durch Wärme und Licht. *Sitz. d. deutsch. naturw. med. Böhmen Losos.*
- 1896. — Über Beeinflussung und Entwicklung des Pigments. *Arch. f. mik. Anat.* Bd. 47.
- 1901. — Untersuchungen über vitale Färbung. *Anat. Hefte.* 51-53.
- Fischer et Rose.** — 1913. — (Carotine dans les calculs biliaires de vache) *Zeitsch. f. physiol. Chemie.* Bd. 88.
- Flemming.** — 1837. — Einfluss von Licht und Temperatur auf die Färbung der Salamanderlarve. *Arch. f. mikr. Anat.* Bd. 48.
- Focillon.** — 1851. — Sur les couleurs du test des Crustacés. *C. R. Acad. Sc. Paris.* T. 33.
- Franz.** — 1908. — Die Struktur der Pigmentzellen. *Biol. Ctbl.* Bd. 28.
- 1910. — Zur Struktur der chromatophoren bei Crustaceen. *Biol. Ctbl.* Bd. 30.
- Frey et Gigon.** — 1909. — (Réaction du formol avec guanine et glycylytyrosine). *Biochem. Zeischr.*
- Fröhlich.** — 1910. — Farbenwechselreaktionen bei Palæmon. *Arch. f. Entwickl. Mech. d. Organismen.* Bd. 29.
- Fuchs.** — 1906. — Zur Physiol. der Pigmentzellen. *Biol. Ctbl.* Bd. 26.
- 1910. — Der Farbenwechsel und die chromatische Hautfunktion der Tiere. *Handbuch. d. vergl. Physiol.* Winterstein. Bd. III.
- Funk.** — 1912. — Action des oxydases sur quelques dérivés de la tyrosine. *Journ. chem. Society.* T. 101. London.
- Von Fürth.** — 1904 — Physiologische und chemische Untersuchungen über melanotische Pigment. *Ztbl. f. Pathol.* № 15.
- Von Fürth et Jérusalem.** — 1907. — Zur Kenntniss der

melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. *Hofmeisters Beiträge*.

Von Fürth et Schneider. — 1901. — Über tierische Tyrosinase und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung. *Hofmeisters Beiträge*.

Gossard. — 1901. — Etudes sur la tyrosinase. *Ann. Inst. Pasteur*, T. XV.

— 1903. — Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval *C. R. Acad. des Sciences*, Paris, T. 136.

— 1904. — Sur deux phénomènes de coloration dus à la tyrosinase. *C. R. Soc. Biol.*

— 1904. — Tyrosinase de la mouche dorée. *C. R. Acad. Sc. Paris*.

Gortner. — 1910. — Contribution to the studies of the oxydases. *Chem. Soc.* T. 97. London.

— 1910. — The origin of the brown pigment in the integuments of the larva of *Tenebrio molitor*. *Journ. of biol. Chem.*

— 1911. — Studies on melanin. The pigmentation of *Cicada*. *Journ. of biol. Chemistry*.

— 1912. — Sur les pigments animaux d'origine mélanique. *Bull. Soc. chimique de France*.

— 1913. — Studies on mélanin. *Ann. Chem. Soc.* T. 35.

Grandmougin. — 1913. — Über der roten Farbstoff der gekochten Krebse. *Chem. Zeitung*.

Griffiths. — 1900. — Sur la matière colorante d'*Echinus esculentus*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, T. 131.

Guillermond. — 1912. — Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'amidon et sur les plastes des végétaux. *Arch. Anat. mic.* T. XIV.

— 1919. — Recherches sur l'origine des chromoplasmes et le mode de formation des pigments du groupe des xanthophylles et des carotines. *Revue générale de botanique*, T. 31.

Harlay. — 1900. — De l'application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques. *Thèse de Pharmacie*, Paris, 1899-1900.

Haussmann. — Cité d'après Oberndorfer.

- Heim.** — 1892. — Etudes sur le sang des Crustacés Décapodes, suivies d'un essai sur le rôle des pigments. *Thèse de Sc. Paris.* et *Ann. de la Soc. Entom. de France.* T. 61.
- Hess et Myers.** — 1920. — Un cas de carotinémié chez l'homme. *Journ. of the Amer. med. Association.*
- Hollande.** — 1914. — Les cérodécytes ou œnocytes des insectes considérés au point de vue bio-chimique. *Arch. Anat. Micr.* T. 16.
- 1920. — Formation de pigment brun-noir au cours de la phagocytose chez les Insectes. *C. R. Soc. Biol.*
- Ishisaka.** — 1908. — Über künstliche Melanine. *Arch. f. exper. Path. und Pharm.* Bd. LVIII.
- Keeble et Gamble.** — 1904. — Présence de graisse dans les cellules pigmentaires des Crustacés. *Zool. Anz.* Bd. 27.
- 1904. — Couleurs des Crustacés supérieurs. *Phil. Trans. of the Roy. Soc.* London. Ser. B. Vol. 196.
1906. — Couleurs des Crustacés supérieurs. *Phil. Trans. of the Roy. Soc.* London. Ser. B. Vol. 198.
- Mlle Kœnigs.** — 1915. — Etude de l'excitabilité des nerfs vaso-moteurs et pigmento-moteurs. *Thèse Sc. Nat. Paris.*
- Kohl.** — 1902. — Untersuch. über das Carotin und seine physiol. Bedeutung in der Pflanze. *Leipzig.*
- Kornfeld.** — 1913. — Über das Vorkommen von Alizarin im Krebspanzer. *Chem. Zeitung.* 37.
- Krükenberg.** — 1882. — Der Dotterfarbstoff von Maia squinado und die Lipochromogene der Crustaceen. *Vergl. Physiol. Studien.* 2 Reihe, 3te Abteil.
- Kunckel d'Herculais.** — 1892. — Le criquet pèlerin et ses changements de coloration. *C. R. Acad. Sc.*
- Lambling.** — 1920. — Précis de Biochimie. Paris Masson.
- Landolt.** — 1899. — Über das Melanine der Augenhäute. *Ztsch. physiol. Chemie.* Bd. 28.
- Lereboullet.** — 1851. — Note sur les variétés rouge et bleue de l'écrevisse fluviale. *C. R. Acad. Sc. Paris.* T. 33.
- Linossier.** — 1920. — Les lipoïdes dans les infections et l'immunité. Paris. Baillière.

- Loisel.** — 1903. — Caractérisation des Lécithines. *C. R. Soc. Biol.*
- Dubarsch.** — 1897. — Zur Frage der Pigmentbildung. *Anat. Anz.* Bd. XIII.
- Lutz.** — 1917. — Zur Kenntniss der biologischen Wirkung auf die Haut mit spezieller Berücksichtigung der Pigmentbildung. *Arch. f. Dermat. u. Syphilis.* Bd. 124.
- Macallum.** — 1895. — On the distribution of assimilated iron compounds other than hæmoglobin and hæmatin in animal and vegetable cells. *Quart. J. mic. Sc.* Vol. 38.
- Maillard.** — 1913. — Genèse des matières protéiques et des matières humiques. *Thèse Sc. phys.* Paris. Masson.
- 1914. — Sur le virage de la phénolphtaléine dans le dosage des acides amidés. *C. R. Soc. Biol.*
- Maly.** — 1881. — Über die Dotterpigmente. *Berichte d. Kais. Akad. Wiss. Wien.* Bd. 83.
- Mandoul.** — 1903. — Recherches sur les colorations tégumentaires. *Thèse Sc. Nat.* Paris.
- Mann.** — 1902. — Physiological Histology. Oxford.
- Megusar.** — 1912. — Experimente über den Farbenwechsel der Crustaceen. *Arch. f. Entw. Mech. d. Organismen.* Bd. 33.
- Merejkowski.** — 1881. — Sur la Tétronérythrine dans le règne animal et sur son rôle physiologique. *C. R. Acad. Sc.* T. 93.
- 1883. — Sur la Tétronérythrine. *Bull. Zool. de France.*
- Moseley.** — 1877. — On the colouring matter of various animals. *Quart. J. mic. Sc.* Vol. 17.
- Neuberg.** — 1908. — Enzymatische Umwandlung von Adrenalin. — *Biochem. Ztsch.*
- 1908. — Zur chemische Kenntniss der Melanome. *Virchows Arch. f. path. Anat. u. Physiol.*
- Newbigin.** — 1897. — Pigments of the Decapod Crustacea. *Journ. of Physiol.* T. 21.
- 1898. — Colour in nature, a study in biology. London. Murray.
- Oberndorfer.** — 1908. — Pigment und pigmentbildung. *Ergebn. der Pällg. Path. Lubarsch.* Bd. XII.

- Onslow.** — 1915. — Chimie des couleurs extérieures des animaux. *Proc. of the Royal Soc.*
- Paladino.** — 1909. — L'encre noire des Céphalopodes. *Bioch. Zeitschr.*
- Palmer et Eckles.** — 1914. — Carotin, the principal natural yellow pigment of milk fat, etc. *Journ. of biol. Chemistry.*
- Phisalix.** — 1898. — Sur la présence d'une oxydase dans la peau de grenouille verte. *C. R. Soc. Biol.*
- 1905. — Sur le changement de coloration des larves de *Phyllodroma germanica*. *C. R. Soc. Biol.*
- Piettre.** — 1911. — Sur les pigments mélaniques d'origine animale. *C. R. Acad. Sc. 2 notes : pages 782 et 1037.*
- 1912. — Influence de quelques composés chimiques sur les mélanines artificielles. *C. R. Acad. Sc. P. 155.*
- Plato.** — 1900. — Über die vitale Färbbarkeit der Phagocyten des Menschen. *Arch. f. mik. Anat. Bd. LVI.*
- Pouchet.** — 1872. — Sur les rapides changements de coloration provoqués expérimentalement chez les Crustacés. *Journ. Anat. et Physiol.*
- 1873. — Recherches anat. sur la coloration bleue des Crustacés. *Journ. Anat. et Physiol.*
- 1876. — Sur les changements de coloration sous l'influence des nerfs. *Journ. Anat. et Physiol.*
- 1891. — Sur une mélanine artificielle. *C. R. Acad. Sc. T. 112.*
- 1892. — Sur la formation du pigment mélanique. *C. R. Soc. Biol.*
- Prenant.** — 1904. — Traité d'histologie. Schleicher. Paris. (avec BOUIN).
- 1910. — Méthodes et résultats de la microchimie. *Journ. Anat. et Physiol. Année XLVI.*
- 1920. — Sur les phénomènes de la pigmentation chez les larves d'Anoures. *C. R. Soc. Biol. T. 83.*
- Primavera.** — 1908. — Contributo allo studio dei melanosarcomi. *Giorn. d. Sc. mediche. T. 29.*

- Przibram.** — 1901. — Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung. *Hofmeisters Beiträge*.
- Reinke.** — 1893. — Über Pigment und deren Bildung bei Tieren. *Naturf. Ges. zu Rostock*.
1894. — Zellstudien. *Arch. f. mik. Anat.* Bd. 43.
- del Rio-Hortega.** — 1917. — Contribucion al conocimiento de las epitheliolibrillas. *Trabajos del Labor. de Investig. biologicas de la Univers.* Madrid. T. XV.
- Robson.** — 1912. — Effets de la sacculine sur le métabolisme de la graisse de son hôte. *Quart. Journ. mic. Sc. N. S.* 57.
- Ronchèse.** — 1907. — Nouveau procédé de dosage de l'ammoniaque. *Bull. Soc. chimique et C. R. Soc. Biol.*
- Salkowski et Jacoby.** — Cités d'après Oberndorfer.
- H. Schiff.** — 1901. — Trennung von Amin und Säurefunktion in Lösungen von Aminosäuren mittelst Formaldehyd. *Ann. d. Chem. u. Pharmacie.* Bd. 319.
- Schmidt.** — 1917. — Die Chromatophoren der Reptilienhaut. *Arch. f. mik. Anat.* Bd. 90.
- Schmiedeberg.** — 1897. — Über Elementarformeln einiger Eiweißkörper und über die Zusammensetzung und die Natur der Melanin. *Arch. f. exper. Path. und Pharmac.* Bd. 39.
- Schneider.** — 1902. — Lehrbuch der vergleichende Histologie. Jena. Fischer.
- Schulze.** — 1913. — Studien über tierische Körper der Carotingruppe: Insecta. *Gesellschaft naturforschender Freunde.* Berlin.
- Smith.** — 1912. — Sexual changes in the blood of *Carcinus maenas*. *Quart. J. mic. Sc. N. S.* 57.
- Sørensen.** — 1910. — Quantitative Bestimmung der Aminosäuren. *Ztschr. F. physiol. Chemie.* Bd. 64.
- Spiegler.** — 1904. — Über das Haarpigment. *Beiträge z. chemischen Physiol. u. Path.* Bd IV.
- 1907. — Über das Haarpigment nebst Versuchen über das

Choroidealpigment. *Beitr. z. chem. Pyhsiol. u. Path.*
Bd. X.

Von Szily. — 1911. — Über die Entstehung des melano-
tischen pigments im Auge der Wirbeltier embryonen
und in Chorioidealsarkomen. *Arch. f. mik. Anat.* Bd. 38.

Thudichum. — 1887. — Über das Lutein *Centralbl. f. d.*
men. Wissench. Bd. 7.

Tobler. — 1912. — Zur Bildung des Lycopins und über
Beziehungen zwischen Farb. und Speicherstoffen bei
Daucus. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*

Tswett. — 1911. — Über den makro-und mikrochemischen
Nachweiss des Carotins. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*

— 1912. — Chlorophylle et pigments végétaux. *Revue générale*
des Sciences. Paris.

Turchini. — 1919. — Processus cytologiques de l'élimina-
tion des matières colorantes par le rein. *Thèse*
Médecine. Paris.

Vegezzi. — 1916. — Recherches sur quelques pigments des
Invertébrés. *Thèse Doctorat ès Sciences.* Fribourg.

Verne. — 1919. — Formation expérimentale de Mélanine
chez les Crustacés. *C. R. Soc. Biol.* T. 82.

— 1920. — Étude histochimique de la formation de la mé-
lanine chez les Crustacés. *C. R. Soc. Biol.* T. 83.

— 1920. — Sur la nature du pigment rouge des Crustacés.
Ibid.

— 1920. — Sur l'oxydation du Carotène des Crustacés. *Ibid.*

Wagner. — 1896. — Le développement de *Neomysis vulga-*
ris. *Abhandl. d. Ges. Russischen Naturforsch.* Vol. 26.

Weindl. — 1907. — Pigmententstehung auf Grund vorge-
bildeter Tyrosinasen. *Arch. f. Entwickl. Mechan.*
Bd. XXIII, H. 4.

Wiener. — 1916. — Beiträge zum mikrochemischen Nach-
weiss des Eisens in der Pflanze, insbesondere des
« maskierten ». *Biochem. Zeitsc.* Bd. 72.

- Willstätter et Escher.** — 1910. — Farbstoff der Tomate. *Ztschr. phys. Chemie*, Bd. 64.
- Willstätter et Mieg.** — 1907. — (Recherches sur la Carotine végétale). *Annalen d. Chemie u. Pharmazie*, Bd. 355.
- Wolff.** — 1910. — Action de la Tyrosinase. *C. R. Acad. Sc.* Paris. T. 150.
- Wurm.** — 1871. — Die Tetronerythrin. *Zeitsch. f. wiss. Zoologie*, Bd. 21.
- Zopf.** — 1893. — Über Produktion von carotinartigen Farbstoffen bei niederen Tieren. *Beiträge Physiol. u. Morph. nieder. Organismen*, H. 3.
-

Table des Matières

	Pages
AVANT-PROPOS.	9
PLAN DU TRAVAIL	15
CHAPITRE I. — Répartition des pigments tégumentaires. — Etude de l'hypoderme et de la carapace pour la localisation des pigments. — Développement des chromatophores. — Développement des systèmes pigmentaires. . .	17
CHAPITRE II. — Description morphologique de la cellule pigmentaire. — Revue des travaux. — Critique	29
CHAPITRE III. — Nature et classification des pigments. — Revue des travaux morphologiques. — A quelle classification ont abouti mes observations personnelles	35
CHAPITRE IV. — Technique. — Matériel.	42
CHAPITRE V. — Série azotée d'origine protéique. .	49
Définition	50
1 ^{re} Partie. Décapodes à mélanine.	
A) Pigment amino-acide	52
B) Mélanine	75
C) Formation de la mélanine	83
2 ^e Partie. Décapodes sans mélanine.	
Explication de la non formation de mélanine.	114
CHAPITRE VI. — Série de la Zooérythrine ou des composés carotinoïdes	121
1 ^{re} Partie. Zooérythrine	122
2 ^e Partie. Pigment dérivé de la Zooérythrine ou Carotinalbumine	160
CHAPITRE VII. — Problèmes biologiques soulevés par l'étude des pigments des Crustacés. . . .	171
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.	181
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	185

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche I

FIGURE 1. — Hypoderme de la face dorsale du céphalo-thorax de *Cancer pagurus*. Examen à l'état frais après étalement ($\times 400$). Mélanophores sur le plan le plus superficiel et Amino-acidophores dont 3 présentent un début de mélanisation. Tous ces éléments sont à l'état d'expansion moyenne.

FIGURE 2. — Amino-acidophores en voie de mélanisation. Coupe de l'hypoderme de la face dorsale du thorax. *Cancer pagurus*. Fixation par l'alcool absolu, sans coloration ($\times 1.400$) Granules de pigment amino-acide. Apparition des grains de mélanine.

FIGURE 3. — Même objet que fig. 2, mais chez *Carcinus maenas*. On voit en clair la place d'un noyau.

FIGURE 4. — Coupe transversale de l'hypoderme dorsal du céphalo-thorax de *Cancer pagurus*. Fixation alcool absolu chloroforme. Coloration éosine ($\times 150$). Amino-acidophores se formant autour des vaisseaux et des lacunes sanguines dont le contenu est coloré en rose. A la surface, à gauche, formation des mélanophores.

FIGURE 5. — Coupe transversale de l'hypoderme, face ventrale du céphalo-thorax. Même technique que fig. 4. Les Amino-acidophores évoluent jusqu'à la surface sans se transformer en mélanophores.

Planche II

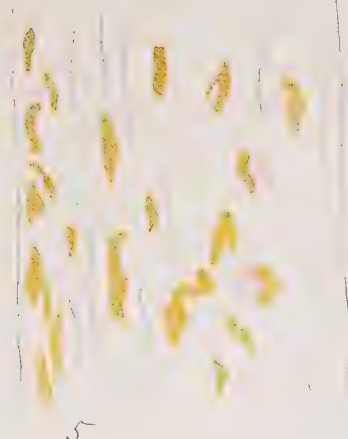
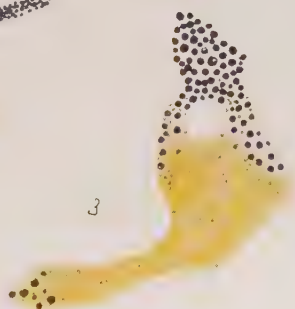
FIGURE 6. — *Palæmon serratus*. Etat frais ($\times 600$). Erythro-
phore en état d'expansion. Le pigment jaunit à l'extrémité
des chromorhizes. Autour de l'érythrophore apparaît une
auréole de pigment bleu dérivé.

FIGURE 7. — *Astacus fluviatilis*. Erythrophore jeune contracté,
traité par une solution iodo-iodurée ($\times 1.200$). La zooé-
rythrine prend une teinte brun-violet. Grains à différents
stade de développement.

FIGURE 8. — *Astacus fluviatilis*. Erythrophore à l'état de
demi-rétraction. Pigment grossièrement granuleux. Etat
frais ($\times 600$). Dans l'hypoderme, on voit des cristaux de
Carotinalbumine bleue.

FIGURE 9. — Larve de *Pinnotheres pisum*, extraite des mem-
branes de l'œuf où elle était contenue. Etat frais ($\times 80$).
Métamérisation des chromatophores.

Imp. de « *L'Expansion Scientifique Française* », 7, rue de Valois.



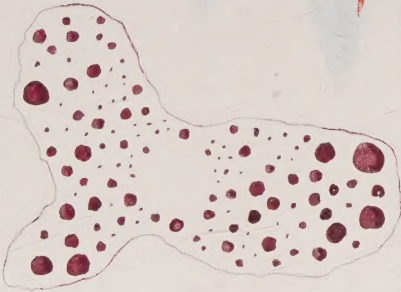
J. Verne del.

G. Debergue, Imp.

6



7



8



9



J. Verne del.

G. Deberque, Imp.

